

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ИШТУЛИН Артем Федорович

**ВЗАИМОСВЯЗЬ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СПЕРМОПЛАЗМЫ
С ПОДВИЖНОСТЬЮ СПЕРМАТОЗОИДОВ У ПАЦИЕНТОВ
С БЕСПЛОДИЕМ**

1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

к.м.н., доцент

Короткова Наталья Васильевна

Рязань – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Влияние витамина В ₁₂ на мужскую фертильность.....	15
1.2. Влияние гипергомоцистеинемии и оксидативного стресса на мужскую фертильность	18
1.3. Роль оксида азота в нарушении мужской фертильности.....	24
1.4. Участие окислительно-модифицированных белков в патогенезе бесплодия у мужчин	27
1.5. Лизосомальный цистеиновый протеолиз	31
1.5.1. Катепсин В.....	37
1.5.2. Катепсин L	39
1.5.3. Катепсин Н.....	40
1.6. Влияние хронического простатита ШВ/синдрома хронической тазовой боли на мужскую фертильность	41
1.7. Роль варикоцеле в патогенезе развития мужского бесплодия	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.1. Характеристика пациентов, включенных в исследование	47
2.2. Получение материала для исследования	49
2.2.1. Сбор эякулята	49
2.2.2. Подсчет подвижности сперматозоидов в эякуляте	49
2.2.3. Подготовка спермоплазмы.....	50
2.3. Определение витамина В ₁₂	51
2.4. Определение гомоцистеина	52
2.5. Оценка показателей оксидативного/нитрозативного стресса	53

2.5.1. Оценка уровня спонтанной окислительной модификации белка	53
2.5.2. Оценка уровня металл-катализируемой окислительной модификации белка	53
2.5.3. Оценка резервно-адаптационного потенциала	54
2.5.4. Определение концентрации конечных метаболитов оксида азота.....	54
2.6. Определение активности катепсинов В, L и Н в спермоплазме	55
2.7. Определение содержания белка в спермоплазме биуретовым методом.....	56
2.8. Методы статистической обработки полученных результатов	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	58
3.1. Макроскопическое и микроскопическое исследование эякулята у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией.....	58
3.2. Подсчет подвижности сперматозоидов в эякуляте у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией.....	59
3.3. Определение концентрации витамина В ₁₂ у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли и с сопутствующей астенозооспермией.....	60
3.4. Определение концентрации витамина В ₁₂ у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией	62
3.5. Определение концентрации гомоцистеина у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли с сопутствующей астенозооспермией.....	64
3.6. Определение концентрации гомоцистеина у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией	67

3.7. Определение уровня окислительной модификации белков в спермоплазме у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией	69
3.7.1. Оценка резервно-адаптационного потенциала спермоплазмы	72
3.7.2. Определение концентрации конечных метаболитов оксида азота в спермоплазме у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией.....	79
3.8. Определение активности катепсинов В, L и Н в спермоплазме у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией.....	81
3.9. Заключение по разделу	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	89
ВЫВОДЫ.....	91
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	92
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	95

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Мужское бесплодие – актуальная проблема современной медицины, оно встречается у 7-10% бесплодных пар [19,23,48,196,211,227,230].

Бесплодие, сформированное вследствие варикоцеле, составляет 21-39% [4,84,104,157,160,234]. Варикоцеле – варикозное изменение вен семенного канатика. Во многих научных публикациях имеются данные об изменении качества спермы (количества, подвижности, морфологии) при данном заболевании. Часто к нарушению сперматогенеза приводят такие факторы, как механическое сдавление семявыносящих путей варикозно-расширенными венами, венозный стаз и ретроградный ток крови, в результате которого увеличивается температура яичек и нарушается синтез стероидов. Из-за повышенного венозного давления в венозную систему левого яичка попадают гормоны коры левого надпочечника, что приводит к нарушению сперматогенеза [28,65].

В 40-70 % случаев причиной бесплодия является хронический простатит. Хронический простатит/синдром хронической тазовой боли (ХП/СХТБ) или простатит категории III – сложное и малоизученное заболевание предстательной железы. Этот тип простатита может быть воспалительным (III А) или не воспалительным (III В) в зависимости от наличия или отсутствия лейкоцитов в секрете предстательной железы [200].

Основной подход к лечению бесплодия включает постановку диагноза и выяснение причины, и с этой целью необходимо проведение биохимических исследований. Функциональная активность сперматозоидов поддерживается спермоплазмой, в которой содержатся такие метаболиты, как белок, ферменты, микроэлементы, лимонная кислота, фруктоза, карнитин и другие [71].

Спермоплазма – это смесь секретов добавочных половых желез, нормальную деятельность которых обеспечивают андрогенные гормоны. Концентрация различных метаболитов в спермоплазме может указывать на функциональное состояние желез мужской половой системы и андрогенную

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

Витамин В₁₂ (цианкобаламин) относится к водорастворимым витаминам группы В, не синтезирующимся в организме человека. Данный витамин содержится в молочных и мясных продуктах, рыбе и яйцах. Основными биохимическими функциями цианкобаламина являются участие в синтезе ДНК, в обмене липидов и аминокислот [115]. При недостатке метилкобаламина, коферментной формы витамина В₁₂, нарушается синтез тимидина, входящего в состав ДНК, что приводит к развитию различных патологических состояний и вполне вероятно, к репродуктивным расстройствам. В настоящее время в научной литературе имеются данные, которые подтверждают взаимосвязь между количеством витамина В₁₂ и качеством спермы, но результаты таких исследований противоречивы и требуют дополнительного более глубокого изучения [112,178,210].

Недостаток витамина В₁₂ в организме человека приводит к снижению каталитической активности фермента метионинсинтазы (КФ 2.1.1.13), катализирующей реакцию синтеза метионина из гомоцистеина [122].

Гомоцистеин (Hcy) – непротеиногенная аминокислота, являющаяся важным промежуточным звеном в нормальном метаболизме метионина у человека. При снижении количества витамина В₁₂ развивается гипергомоцистеинемия, которая, предположительно, может оказывать токсическое действие на сперматогенез и, возможно, приводит к нарушению функций репродуктивной системы у мужчин. При анализе литературных источников было выявлено много противоречивых данных по этому вопросу, в связи с чем проблема является актуальной в современном обществе, в котором увеличивается процент мужского бесплодия [19,23,112,178,196,210,211,227].

Вероятно, увеличение количества гомоцистеина в спермоплазме может быть ассоциировано со снижением фертильности у мужчин. Гомоцистеин является провокатором свободных радикалов и приводит к развитию окислительного стресса (ОС) и накоплению окислительно модифицированных белков (ОМБ). ОМБ являются ранним маркером деструкции белков под действием активных форм кислорода (АФК) или активных форм азота (АФА), в результате белки теряют свои нативные свойства. Также к ОС может приводить оксид азота, избыток которого может превращаться в пероксинитрит, а последний, в свою очередь, приводит к повреждению клетки. И, таким образом, как ОМБ, так и стабильные конечные метаболиты оксида азота, могут явиться маркером состояний, приводящих к снижению мужской фертильности [139,202].

Катепсины – это протеолитические ферменты, в активном центре которых присутствуют остатки цистеина, серина или аспарагиновой кислоты. Цистеиновые катепсины содержатся в лизосомах и принимают участие во внутриклеточном обмене белков, разрушая внутренние пептидные связи. Предположительно, катепсины В, L и Н, содержатся в акросоме сперматозоидов. Тиоловые группы, находящиеся в активном центре ферментов, при окислении образуют дисульфидные связи, что приводит к потере активности фермента [56].

Степень разработанности темы

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

В литературных источниках имеются данные, что снижение количества витамина В₁₂ в плазме крови, может приводить к различным репродуктивным расстройствам у мужчин [112]. Но в то же время эта тема изучена не до конца и не имеет однозначных результатов исследования. Недостаток витамина В₁₂

приводит к снижению каталитической активности метионинсинтазы - фермента, катализирующего реакцию синтеза метионина из гомоцистеина. Доказано, что гипергомоцистеинемия может приводить к окислительному стрессу, влияющему на мужскую фертильность [74,83,121,172,194]. Токсическое действие гомоцистеина связано с его химической структурой. По данным научной литературы известно, что при гипергомоцистеинемии ингибируется синтез фермента эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) [140]. Но данные об изменении концентрации гомоцистеина в спермоплазме у мужчин с нарушением репродуктивной функции при ХП/СХТБ и варикоцеле, в литературе практически отсутствуют. Также не встречаются данные о количестве витамина В₁₂ и гомоцистеина и их взаимосвязи с показателями эякулята при ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией в анамнезе. Эта тема требует более глубокого изучения.

Объектом исследования явились пациенты с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией, сопровождающимися бесплодием. Контрольную группу составили здоровые мужчины с нормозооспермией, проходившие исследование спермограммы перед экстракорпоральным оплодотворением.

Материал исследования спермоплазма.

Работа выполнена на кафедре биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

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

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

4. Оценить взаимосвязи между подвижностью сперматозоидов и концентрацией витамина В₁₂, гомоцистеина, карбонилированных белков, активностью цистеиновых катепсинов (В, L, Н) в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией, ассоциированными с бесплодием.

Научная новизна

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

что активность цистеиновых катепсинов В, L, Н у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией выше, чем у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией.

В ходе исследования впервые было определено количество витамина В₁₂ в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией. Обнаружено статистически значимое снижение уровня витамина В₁₂ в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией. Также в ходе нашего исследования было обнаружено повышение уровня гомоцистеина в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией. При определении уровня окислительной модификации белков спермоплазмы у пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией было отмечено нарастание уровня ранних и поздних маркеров окислительной деструкции белка.

Теоретическая и практическая значимость

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

Методология и методы исследования

Подсчет подвижности сперматозоидов в эякуляте выполняли на автоматическом спермоанализаторе АФС-500-2, (Россия). Определение цианкобаламина (витамина В₁₂) проводили методом конкурентного ИФА с

помощью набора фирмы «Cloud-Clone Corp.» (Китай). Определение гомоцистеина также проводили методом конкурентного ИФА с помощью набора фирмы «Cloud-Clone Corp.» (Китай). Для определения концентрации метаболитов оксида NO (нитритов и нитратов) использовали метод в модификации В.А. Метельской [46]. Определение окислительной модификации белков в спермоплазме проводили по методу R.L. Levine [111] в модификации Е.Е. Дубининой [57]. Активность катепсинов В, L, Н изучали спектрофлуориметрическим методом по Barrett и Kirschke [88]. Для оценки устойчивости системы к окислительному воздействию проводили анализ резервно-адаптационного потенциала. Измерение концентрации белка в спермоплазме осуществлялось биуретовым методом с использованием коммерческих наборов производства фирмы «Mindray» (Китай). Данный набор предназначен для количественного определения общего белка биуретовым методом в биологических жидкостях.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Концентрация витамина В₁₂ снижена, уровень гомоцистеина повышен в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией по сравнению с контрольной группой пациентов, что может быть использовано в качестве дополнительных биохимических маркеров снижения мужской фертильности.

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

3. Активность лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией снижена по сравнению с контрольной

группой пациентов, что может ассоциироваться с нарушением протеолиза и сопряженных процессов при снижении мужской фертильности.

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

Степень достоверности и апробация результатов

Полученные в ходе исследования результаты доложены на конференциях:

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

2. Научно-практическая конференция (69-я годовичная) ГОУ «Таджикский государственный медицинский университет им. Абуали ибни Сино» с международным участием «Достижения и проблемы фундаментальной науки и клинической медицины», посвященная 30-летию Государственной независимости Республики Таджикистан и «Годам развития села, туризма и народных ремёсел (2019-2021)» (Душанбе, 2021).

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

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

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

(Рязань, 2022).

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

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

Личный вклад автора

Формулировка целей и задач, решение поставленных задач, изложенных в диссертации, анализ научной литературы по данному вопросу, все лабораторные исследования, статистическая обработка полученных результатов, систематизация результатов проводилась автором самостоятельно при непосредственном участии научного руководителя.

Сведения о внедрении

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

Объем и содержание работы

Диссертационная работа включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, главу с описанием материалов и методов исследования, результаты собственных исследований с их обсуждением, заключение, выводы,

практические рекомендации, список литературы. Объем работы составляет 124 страницы машинописного текста, содержит 9 таблиц, проиллюстрирован 44 рисунками.

Список литературы включает 242 источника: 82 отечественных и 160 зарубежных.

Публикации

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

Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю, к.м.н., доценту Коротковой Н.В., ректору ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, д.м.н., профессору Калинину Р.Е., проректору по научной работе и инновационному развитию ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, д.м.н., профессору Сучкову И.А. и заведующему кафедрой биологической химии, к.м.н., доценту Матвеевой И.В. за всестороннюю помощь на всех этапах исследования, при подготовке и публикации печатных работ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Влияние витамина В₁₂ на мужскую фертильность

Витамин В₁₂ (цианкобаламин) относится к водорастворимым витаминам группы В [213]. В организме человека витамин В₁₂ не синтезируется. Его источниками являются печень, почки, рыба, яйца, молоко и сыр [113]. Витамин В₁₂ превращается в свои коферментные формы: метилкобаламин и дезоксиаденозилкобаламин в печени и почках [216].

Основными биохимическими функциями витамина В₁₂ являются участие в синтезе ДНК, в обмене жирных кислот и в обмене аминокислот [115]. Дефицит витамина В₁₂ приводит к метаболическим нарушениям, например, к развитию мегалобластной анемии [185,239]. Кофермент витамина В₁₂ метилкобаламин участвует в реакции синтеза метионина из гомоцистеина, которую катализирует фермент 5-метилтетрагидрофолат-гомоцистеин-S-метилтрансфераза [216]. Недавние исследования показали, что витамин В₁₂, попадая с кровью в органы мужской репродуктивной системы, существенно может влиять на сперматогенез и качественные показатели спермы [210]. Отмечается снижение концентрации кобаламина в плазме крови у бесплодных мужчин по сравнению с фертильными [112].

Бесплодие является одной из важнейших и глобальных проблем современного общества, в частности, бесплодие у мужчин составляет примерно 7% [49,196,211,230]. Причины, вызывающие бесплодие, различны. В 25% случаев фактором, способствующим мужскому бесплодию, является азооспермия - отсутствие сперматозоидов в эякуляте, у 40% пациентов этиология бесплодия неизвестна [156]. Одним из основных факторов мужского бесплодия является астенозооспермия - снижение подвижности сперматозоидов ниже нормы [66,85]. Работы по изучению влияния витамина В₁₂ на показатели спермограммы начали проводиться еще в прошлом веке.

В 1984 году Isoyama et al. вводил метилкобаламин в дозе 1500 мкг/сут 26 бесплодным пациентам со сниженной подвижностью сперматозоидов в течение 4-24 недель. Через 8 недель отмечалось увеличение подвижности сперматозоидов в 13 случаях (53,8%), в остальных случаях подвижность осталась без изменений [101]. А при введении препарата в аналогичной дозе более 12 недель, повышалась подвижность сперматозоидов и у пациентов с идиопатической олигозооспермией [195].

С 2000 годов S. Sinclair et al. и S. Chatterjee et al. предлагают применять препараты, содержащие витамин В₁₂, в качестве возможной терапии по улучшению параметров сперматозоидов, таких, как количество и подвижность [99,214].

По данным Gual-Frau et al. у бесплодных мужчин с варикоцеле отмечается самый высокий процент сперматозоидов с повреждённой ДНК. В настоящее время имеются данные, что целостность ДНК сперматозоидов повышает антиоксидантная терапия, но о её применении у пациентов с варикоцеле данные отсутствуют. Gual-Frau et al. провели экспериментальные исследования по введению витамина В₁₂ двадцати бесплодным пациентам с диагнозом варикоцеле. Им вводили В₁₂ в дозе 1 мкг/сут в течение 90 дней в составе поливитаминовой терапии, что привело к уменьшению фрагментации ДНК сперматозоидов приблизительно на 22,1%, а также улучшению целостности ДНК сперматозоидов [178].

Известно, что недостаток витамина В₁₂ в организме человека приводит к снижению каталитической активности метионинсинтазы – фермента, катализирующего реакцию синтеза метионина из гомоцистеина (Рисунок 1).

Исследования в области изучения витамина В₁₂, как показателя мужской фертильности, показывают, что указанный витамин оказывает положительное влияние на показатели спермограммы, а изменение его концентрации может использоваться в качестве показателя маркера мужской фертильности. В то же время имеются работы, не подтверждающие данный факт.

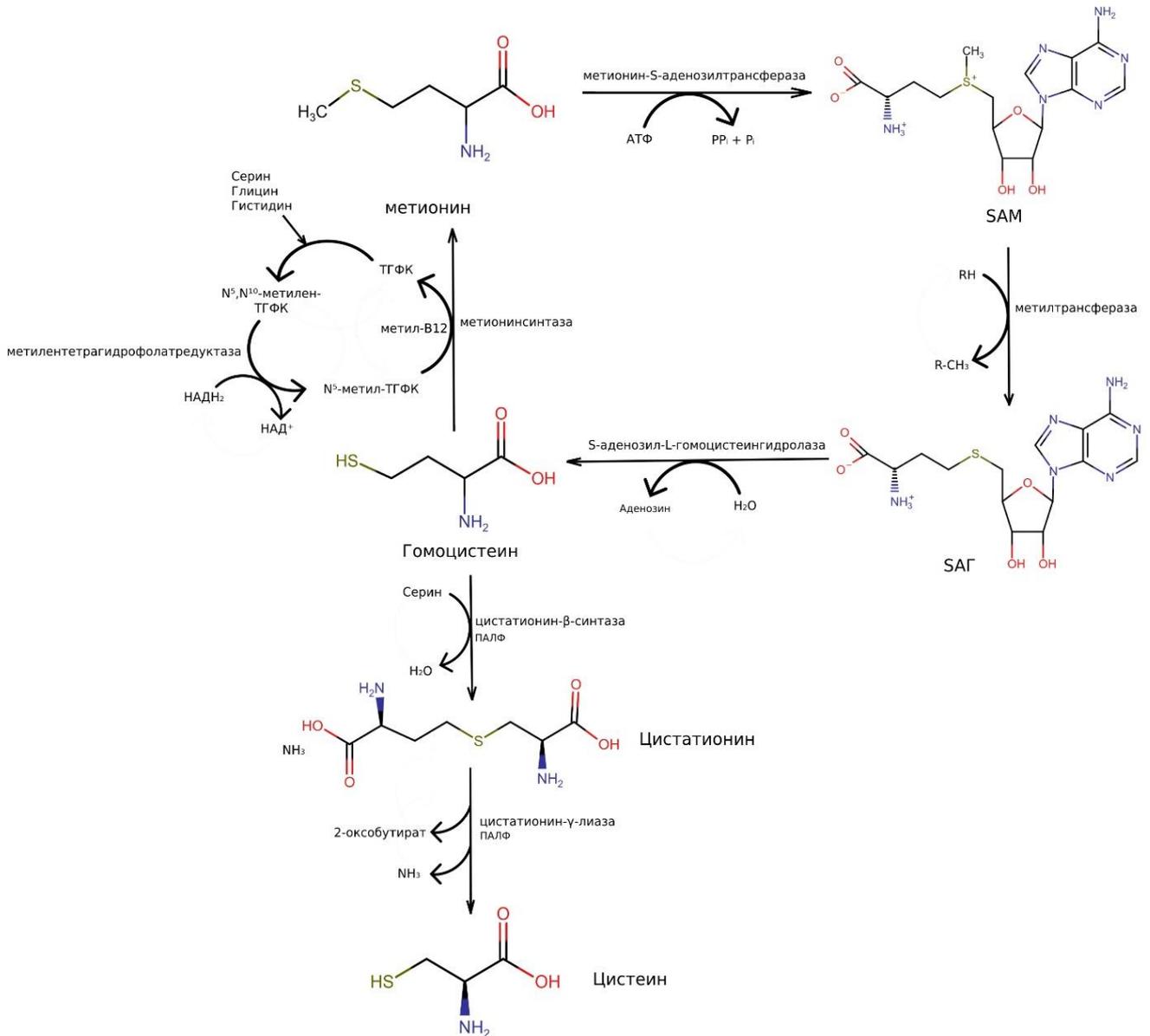


Рисунок 1 – Метаболизм метионина и гомоцистеина у человека

В исследовании Halim et al. не было отмечено улучшения качества спермы при приеме витамина B₁₂ [148]. В работах Chen et al. было выявлено незначительное изменение концентрации цианкобаламина между фертильными и бесплодными мужчинами [102]. В связи с этим, представленная тема является весьма актуальной, требующей дальнейших исследований и поиска молекулярных механизмов влияния витамина B₁₂ на состояние мужской фертильности.

1.2. Влияние гипергомоцистеинемии и оксидативного стресса на мужскую фертильность

Гомоцистеин относится к непротеиногенным серосодержащим аминокислотам и является важным промежуточным звеном в нормальном метаболизме человека [44]. Он образуется в процессе отщепления метильной группы от S-аденозилметионина, с образованием S-аденозилгомоцистеина, который в последующем под действием фермента аденозилгомоцистеиназы (КФ 3.3.1.1) превращается в аденозин и гомоцистеин [203,207]. Обезвреживание гомоцистеина в клетках происходит двумя путями, так как в больших количествах он оказывает токсическое действие на организм человека.

При реметилировании Hcy превращается в метионин, а при транссульфурировании происходит перенос серы с гомоцистеина на аминокислоту серин с дальнейшим образованием цистеина.

Метаболизм гомоцистеина зависит от количества коферментных форм витаминов (В₆, В₉, В₁₂). В реметилировании принимает участие фермент метионинсинтаза, а коферментом в реакции является метилкобаламин. Донором метильной группы в этой реакции используется производное фолиевой кислоты (N⁵ метил-ТГФК). В транссульфурировании участвует фермент цистатионин-β-синтаза (КФ 4.2.1.22) и цистатионин-γ-лиаза (КФ 4.4.1.1) (Рисунок 2), а в качестве кофермента в этом пути обезвреживания гомоцистеина выступает пиридоксальфосфат, поэтому при недостатке этих витаминов может возникнуть гипергомоцистеинемия [184].

В организме человека повышение уровня гомоцистеина связано в большой степени с изменением в гене метилентетрагидрофолатредуктазы, но также может наблюдаться при недостатке витаминов группы В и фолатов [107,123,137]. Уровень Hcy увеличивается на фоне пролиферативных заболеваний и при нарушении выведения гомоцистеина из организма почками.

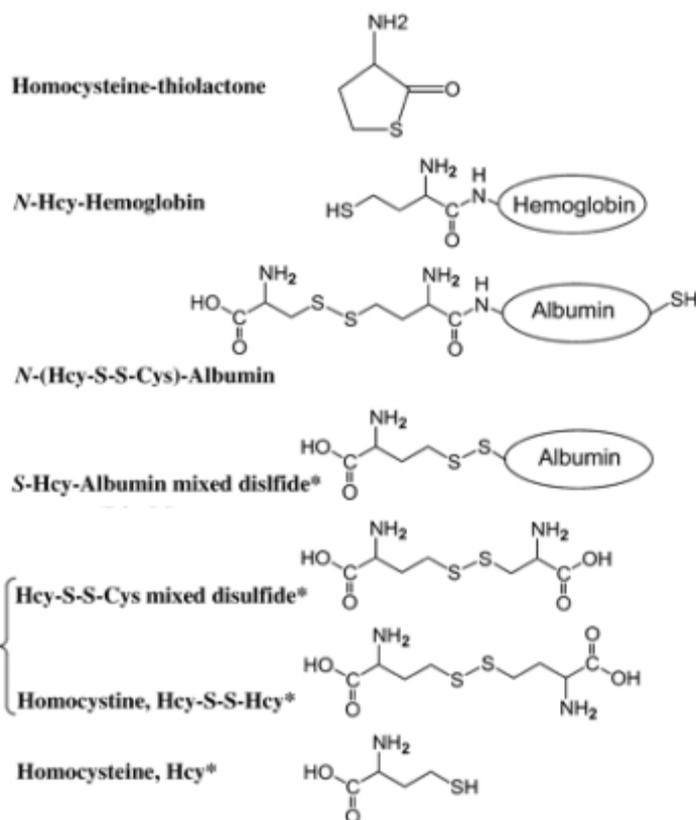


Рисунок 3 – Структуры гомоцистеина в плазме крови
(цит. по: Jakubowski H., 2011) [150]

Первый тип гомоцистеинилирование – это связывание с сульфгидрильными и аминогруппами в белках. Восстановленный гомоцистеин способен неферментативно реагировать с тиольными группами остатков цистеина в белках и пептидах (*S*-гомоцистеинилирование), а образующийся под действием метионил-тРНК-синтетазы из гомоцистеина тиолактон – с ϵ -аминогруппами лизина (*N*-гомоцистеинилирование) [130, 149, 173] (Рисунок 4).

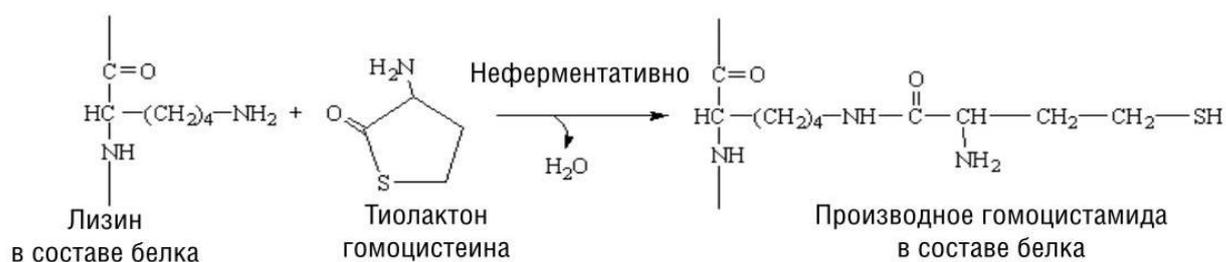


Рисунок 4 – Ковалентная модификация белков в процессе *N*-гомоцистеинилирования (цит. по: Медведев Д.В. и др., 2017) [43]

Второй тип – восстановление кислорода в присутствии ионов металлов [217]. Третий тип – присоединение оксида азота с образованием S-нитрозогомоцистеина [151].

Гипергомоцистеинемия может привести к развитию окислительного стресса [43]. Понятие «Окислительный стресс» было впервые введено в 1991 году Н. Sies. ОС – это повреждение клеток организма человека, которое наблюдается при нарушении механизмов антиоксидантной защиты или при увеличении выработки активных форм кислорода, оказывающих токсическое действие [58,60,182]. Нарушение работы антиоксидантной защиты организма может быть связано с такими ферментами, как супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1), каталаза (КФ 1.11.1.6), глутатионпероксидаза (ГП; КФ 1.11.1.9), глутатионредуктаза (КФ 1.8.1.7) [6,37]. Еще одной причиной нарушения работы антиоксидантной системы организма являются экзогенные антиоксиданты [40,164,165]. Процессы свободно-радикального окисления приводят к разнообразным патологическим состояниям и заболеваниям [42]. Повышенная концентрация окисленных молекул в организме человека при продолжительном воздействии способствует формированию различных атипичных состояний, а также усиливает катаболизм белков. В результате ОС могут возникать повреждения структуры липидов, белков, нуклеиновых кислот, а также нарушается синтез простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов [25,26,181], что приводит к запуску механизма множественных клеточных ответов.

Существует мнение, что в основе патогенеза таких заболеваний как ХП/СХТБ и варикоцеле лежит окислительный стресс [103,166,209].

В научной литературе встречаются разные описания механизмов развития окислительного стресса у мужчин с нарушением репродуктивной функции [10,51]. Можно выделить 3 основных механизма взаимосвязи ОС и мужской фертильности.

Первый механизм связан со снижением подвижности сперматозоидов. Снижение подвижности сперматозоидов наблюдается вследствие окислительного повреждения митохондрий из-за уменьшения выработки энергии. В данном

случае нарушается гибкость мембраны половых клеток из-за увеличения активных форм кислорода.

Второй механизм связан с нарушением проникновения сперматозоидов в яйцеклетку. При этом механизме активные формы кислорода способствуют перекисному окислению акросомального участка мембраны.

Третий механизм характеризуется повреждением ДНК сперматозоида активными формами кислорода, что в свою очередь приводит к дефекту отеческого генома [30,55,74,83,92,120,121,172,194,197,223].

В настоящее время встречается много научных работ по поводу свободнорадикального окисления и состояния антиоксидантной системы при различных видах нарушения сперматогенеза. Среди них встречаются такие, которые раскрывают причины и механизмы развития окислительного стресса репродуктивной системы мужчин [49,114].

Так, попадание в организм мужчины ксенобиотиков нарушает работу системы детоксикации организма, в результате увеличивается образование активных форм кислорода. Также может наблюдаться дисбаланс между прооксидантами и антиоксидантами, приводящий к развитию окислительного стресса в гонадах и сперме. При проведении исследований спермы было выявлено, что у мужчин, проживающих в промышленных районах с плохой экологической ситуацией, существует прямая взаимосвязь между развитием патозооспермии и содержащимися в эякуляте токсическими веществами [9]. Еще одной причиной развития ОС могут быть вредные привычки (употребление алкоголя, курение). Под действием токсических веществ происходит нарушение свободнорадикальных процессов, что приведет к увеличению активных форм кислорода [29,76].

По данным De Jong et al. было выявлено, что у мужчин, злоупотребляющих алкоголем, отмечалось снижение уровня тестостерона и уровня антиоксидантов в семенной жидкости, а также наличие окислительного стресса [116]. А у курящих мужчин повышается уровень свободных радикалов в эякуляте и уменьшается количество антиоксидантов (витаминов С, Е) [117,215]. По данным некоторых

авторов при боевом стрессе происходит нарушение метаболизма с выраженной активацией свободнорадикальных процессов в мужских репродуктивных органах. Это может быть связано с нарушением работы механизмов центральной и периферической регуляции стероидо- и сперматогенеза [8].

В результате ОС может развиваться некроз или апоптоз клеток из-за генерации вторичных АФК/активных форм азота (АФА) [63]. Свободные радикалы наносят повреждающее действие, которое заключается в изменении свойств биологических мембран вследствие активации перекисного окисления липидов [12,64,90]. Продукты, образующиеся в ходе реакций – малоновый диальдегид, 4-гидрокси-2-ноненаль, 2-акролеин, изофосфат, способствуют усиленному повреждению клетки [59,90,109,168]. Перекисное окисление липидов запускается при воздействии первичного свободного радикала. Теряется атом водорода у метиленовой группы ненасыщенных жирных кислот. Образуются группы $ROO\bullet$ из-за попадания кислорода в ловушку липидного радикала. Группы $ROO\bullet$ могут взаимодействовать друг с другом, и результатом этого взаимодействия будет повреждение мембранных белков [59]. Для данного процесса необходимо наличие кислорода и ненасыщенных жирных кислот. Также малоновый диальдегид может взаимодействовать с тиоловыми группами белков, сшивать аминокислоты и липиды из-за расщепления углеводородных связей в реакциях перекисного окисления липидов [12,47,90]. Результатом этого процесса является образование агрегированных протеиновых молекул, хромолипидов, 4-гидрокси-2-ноненала [17,90]. Новые процессы перекисного окисления могут запускать гидроперекиси липидов под действием ряда факторов, хотя и являются стабильными соединениями [26,27,47,59].

Главным местом образования свободных радикалов является дыхательная цепь митохондрий [12,62]. Они, в свою очередь, инициируют перекисное окисление в цитоплазматическом ретикулуме. В результате этого проницаемость клеточной мембраны увеличивается и усиливается повреждение митохондрий. При постоянном действии свободных радикалов может возникнуть

цитотоксический эффект, который сопровождается прогрессированием старой или появлением новой патологии [73,75].

Активные формы кислорода: супероксид-радикал (O_2^-), пероксидный радикал (HO_2), гидроксил-радикал (OH^-), перекись водорода (H_2O_2), образующиеся из молекулярного кислорода путем многоэтапного восстановления, могут легко трансформироваться друг в друга.

1.3. Роль оксида азота в нарушении мужской фертильности

Оксид азота образуется в организме человека из L-аргинина в результате окисления атомом кислорода при участии фермента NO-синтазы (КФ 1.14.13.39) [1,15,16,158,220] (Рисунок 5).

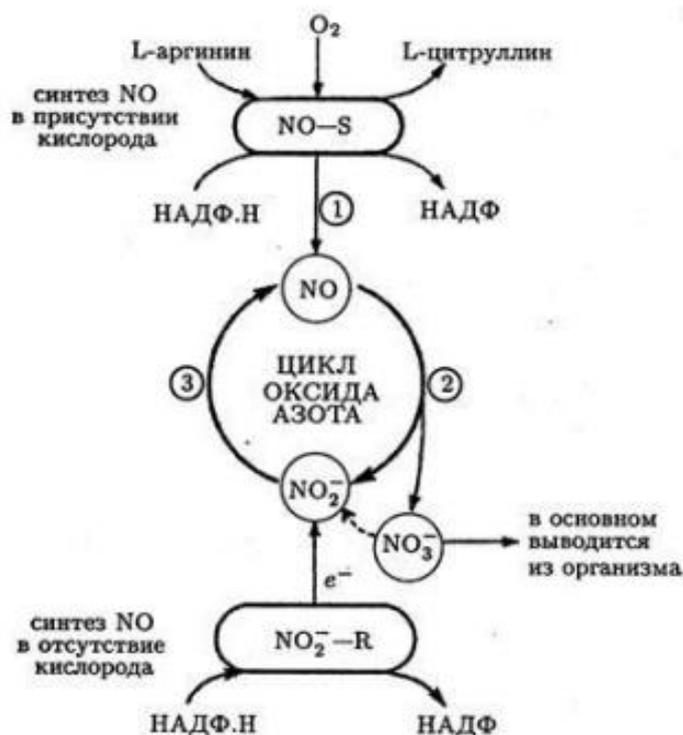


Схема образования NO и цикла оксида азота. NO-синтазная (NO-S) и нитроредуктазная (NO⁻-R) компоненты цикла оксида азота в клетках млекопитающих: 1 — образование NO в результате NO-синтазной реакции; 2 — окисление NO в ионы NO₂⁻ и NO₃⁻; 3 — восстановление NO₂⁻ в NO при участии нитроредуктазных систем

Рисунок 5 – Схема образования NO и цикла оксида азота
(цит. по: Реутов Е.П., 1998) [69]

Существует три изоформы фермента NO-синтазы (КФ 1.14.13.39): эндотелиальные (eNOS), нейрональные (nNOS) и макрофагальные (mNOS) [125,180]. Изоформы различаются по экспрессии и биологическому значению, в связи с чем их разделяют на конститутивную (cNOS) и индуцибельную (iNOS). Нейрональная NO-синтаза является конститутивной; макрофагальная NO-синтаза – индуцибельной формой, а эндотелиальная NO-синтаза является и конститутивной в 80 %, и индуцибельной в 20 % ферментными формами [39,124,152].

Физиологическая роль оксида азота разнообразна. Он вызывает расслабление гладких мышц сосудов, может выступать в качестве нейромедиатора, регулирует программируемую гибель клетки, а также участвует в работе репродуктивной системы [39,50,87,105,127,175,199,229,240] (Таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика NO-синтаз (цит. по: Абутуров А.Е., 2009) [1,36]

Характеристика	eNOS	nNOS	iNOS
Клеточная экспрессия	Эндотелиоциты, кардиомиоциты, тромбоциты, нейроны	Нейроны, эпителиоциты, эндотелиоциты, миоциты скелетных мышц и сосудов, нейтрофилы, тромбоциты, β 3-клетки поджелудочной железы	Макрофаги, нейтрофилы, эпителиоциты, кардиомиоциты, глиальные клетки, миоциты сосудов, эндотелиоциты, нейроны
Субклеточная локализация	Аппарат Гольджи, мембрана клетки в области маленьких инвагинаций, которые содержат трансмембранный кавеолин, ядро клетки, митохондрии	Цитоплазма, эндоплазматический ретикулум, сарколемма	Фагосомы, пероксисомы, мембрана, ядро клетки, митохондрии

В физиологических концентрациях оксид азота проявляет низкую реакционную способность. Может выступать в качестве антиоксиданта (ингибитор процессов перекисного окисления липидов). При избытке NO происходит его превращение в пероксинитрит (ONOO^-), который является сильным окислителем и способен приводить к перекисному окислению липидов, повреждать клетки. Решающим фактором токсичности NO служит соотношение NO и супероксида [177]. В нитрозативном стрессе ключевую роль играют активные формы азота. При данном виде стресса происходит изменение структуры белков, ингибирование их биологических функций [174,177].

По данным S.B. Doshi et al. избыток активных форм азота отрицательно влияет на мужскую репродуктивную систему: снижает секрецию гонадотропина, вызывает дисфункцию яичек и изменяет параметры спермы [202]. Также существует подкласс нейрональной NO-синтазы, который находится в яичках, известный как TnNOS и вносит основной вклад в образование NO [159,176,232,242]. Он локализуется только в клетках Лейдига яичка, можно предположить его участие в стероидогенезе. Активные формы азота встречаются в разных клетках мужской репродуктивной системы (Рисунок 6).

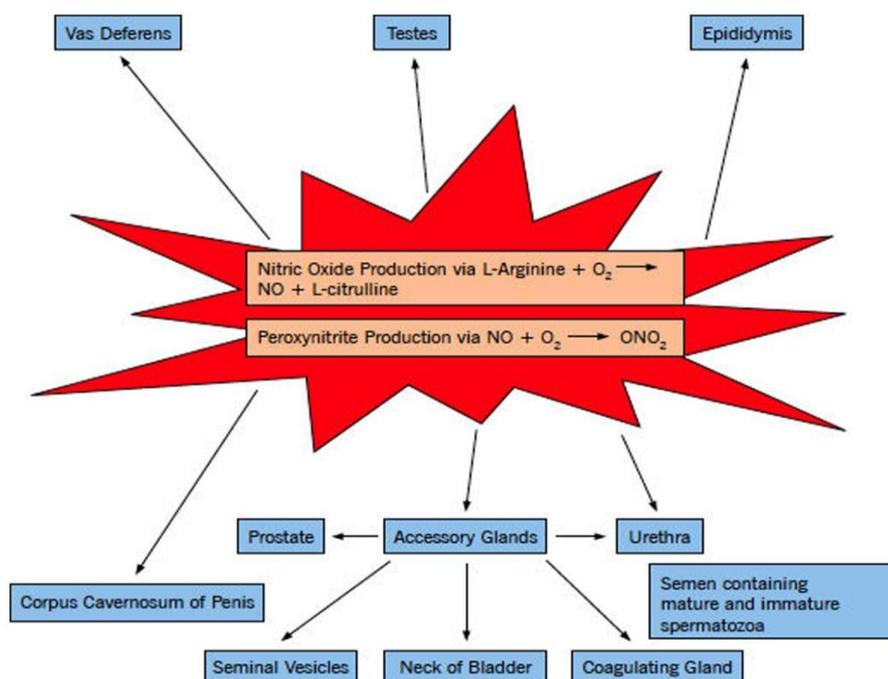


Рисунок 6 – Источники активных форм азота в мужской репродуктивной системе (цит. по: Doshi S.B. et al., 2012) [202]

1.4. Участие окислительно-модифицированных белков в патогенезе бесплодия у мужчин

Окислительная модификация белков – это процесс ковалентной модификации белков в результате воздействия активных форм кислорода или активных форм азота на них [188]. Такие аминокислоты как гистидин, метионин, цистеин, триптофан, аргинин, пролин, участвуют в процессе окислительного изменения белков и способны легко окисляться под действием АФК/АФА [74]. Окислительно модифицированные белки по мнению многих авторов могут образовываться в результате множества реакционно способных соединений, а именно:

- активных форм кислорода (OH^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , O_2);
- активных форм азота (NO^\cdot , ONOO^-) [128,206];
- металлов переменной валентности (Cu^{2+} , Fe^{2+})
- под воздействием продуктов перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, 4- гидрокси-2-ноненаль) [86,190].

Также окислительно-модифицированные белки могут образовываться и при истощении антиоксидантной системы в организме человека, когда наступает дисбаланс антиоксидантов и прооксидантов [7].

Выделяют три механизма окислительного изменения белков [25].

Первый механизм связан с ионизирующей радиацией. Второй механизм сопряжен с действием АФК, которые образуются в ходе химических реакций. Третий механизм связан с металл-зависимым окислением. Окислительная модификация белков может развиваться в результате фрагментации пептидной основы, а также окислительной модификации могут подвергаться и боковые радикалы каждой аминокислоты [22]. При окислительном повреждении белка нарушается его нативная структура. Начинают образовываться агрегированные конгломераты, а также фрагментированные частицы [17].

Выделяют следующие этапы формирования агрегированных белковых молекул:

- 1) из-за свободнорадикального воздействия нарушается нативная конформация белкового домена;
- 2) увеличивается количество гидрофобных остатков;
- 3) формируются белковые конгломераты.

Окислительную модификацию белков можно разделить на обратимую и необратимую. Обратимая ОМБ имеет значение для клеточной сигнализации и характерна для остатков цистеина, в результате образуются следующие конечные продукты: дисульфиды, глутатионтиолы, нитрозотиолы, сульфеновая и сульфоновая кислоты [93]. При необратимой ОМБ теряются биологические свойства белков. При данном типе окисления образуются карбонильные производные белков, нитротирозин, битирозин [192,241] (Рисунок 7).



Рисунок 7 – Варианты окислительной модификации белков
(цит. по: Bivik C., 2008) [91]

При окислительном стрессе могут формироваться альдегидные группы, которые будут являться ранним маркером окислительного стресса, и кето-

группы, которые определяются, как поздний маркер окислительного стресса (Рисунок 8).

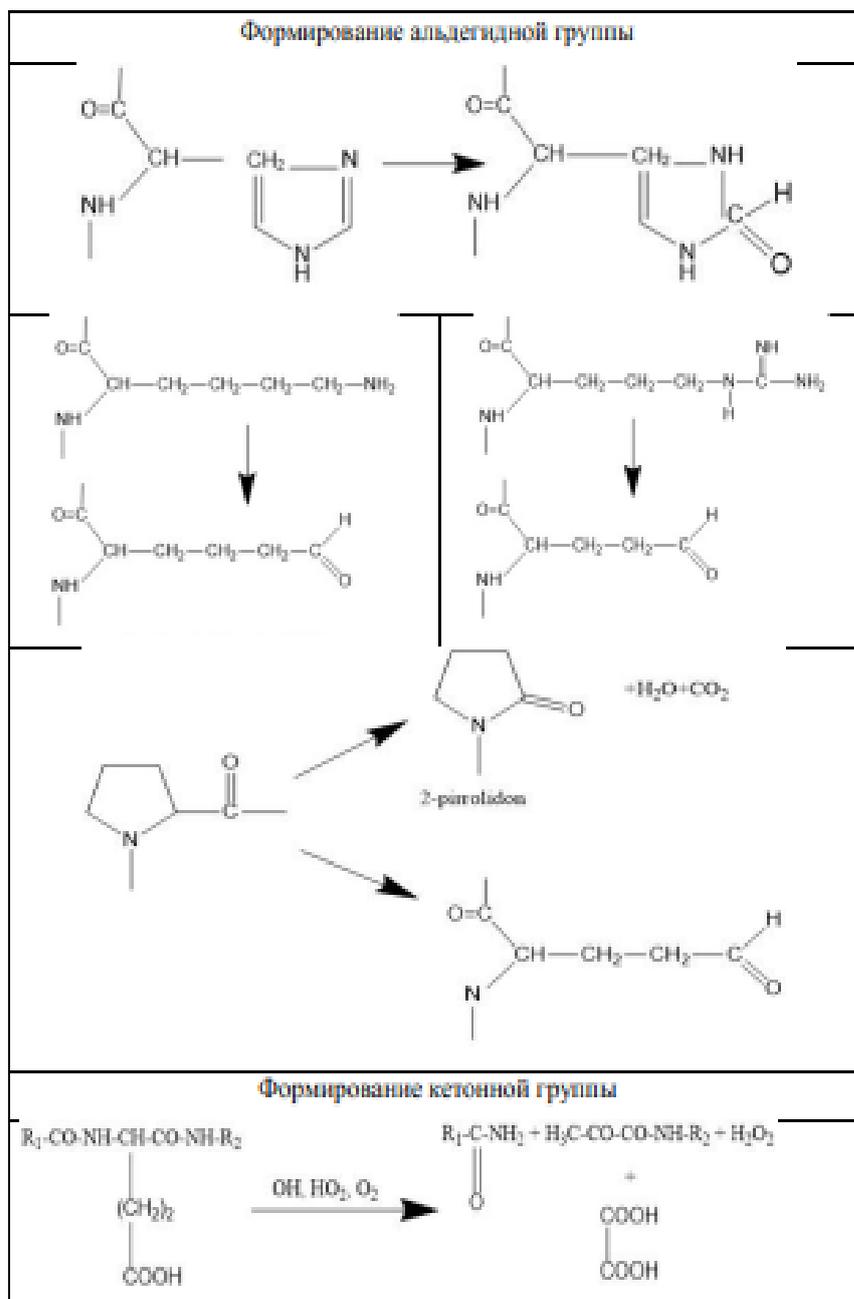


Рисунок 8 – Формирование альдегидной и кето-группы при окислительном карбонилировании белков (цит. по: Фомина М.А., 2014) [78]

К формированию альдегидной группы приводит окисление функциональных групп таких аминокислот, как лизин, пролин, гистидин,

аргинин, а к формированию кето-производных приводит окисление функциональной группы аспартата или глутамата [26,225].

Окислительно модифицированные белки способствуют вторичному повреждению биомолекул [208]. Катаболизм данных белков происходит путем протеолитической утилизации [131], которая может происходить по двум путям: [90,169] с помощью протеаз, а также при разрушении белков с нарушенным фолдингом при участии убиквитин-зависимой протеасомной системы. Агрегированные формы могут накапливаться в организме и, тем самым, способны подавлять функции протеасом, в результате уменьшается протеолиз, что приводит к накоплению ОМБ [180,189,191].

Последствия, которые могут быть связаны с ОМБ [31]:

- инактивация транспортных ферментов ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{АТФ-азы}$);
- подавление шаперона (Hsp90);
- нарушение работы протеин-дисульфидизомеразы.

Во всех вышеперечисленных процессах участвуют альдегиды. Они необходимы для взаимодействия с цистеиновыми и гистидиновыми остатками киназ [56,90,109].

Таким образом, ОМБ могут образовываться под действием разных факторов, которые, возможно, повреждают биополимерные составляющие сперматозоидов. Наиболее сильно этому воздействию подвергаются белковые молекулы, в результате чего формируются карбонильные производные или образуются внутримолекулярные сшивки, что в дальнейшем отрицательно влияет на функции белков. Основываясь на литературных данных, можно считать, что повышение количества карбонилированных белков тесно связано с различными патологическими процессами, протекающими в организме, в том числе, и с нарушением сперматогенеза, что требует более глубокого изучения [11,139].

1.5. Лизосомальный цистеиновый протеолиз

Лизосома – это мембраносвязанная органелла клетки, которая имеется практически во всех клетках эукариот. Исключением являются эритроциты, в которых эти органеллы отсутствуют. Лизосомы можно разделить на первичные (вновь образованные лизосомы, они не участвуют в гидролизе) и вторичные (поздние лизосомы) [70]. В их составе имеются ферменты класса гидролаз, а именно протеазы (КФ 3.4), липазы (КФ 3.1.1.3), фосфатазы (КФ 3.1.3.48), карбогидразы (КФ 3.2.1) [238]. В сперматозоидах функцию лизосом выполняют акросомы, являющиеся видоизменёнными лизосомами [67].

Пути поступления гидролаз в клетку [70,231]:

- cvt-путь (cytoplasm-to-vacuole targeting) этот путь характерен для катепсина Н [219];
- аутофагия;
- эндоцитоз.

Основные протеолитические ферменты лизосом [70]:

- коллагеназы;
- желатиназы;
- аминопептидаза;
- протеиназа 3;
- эластаза;
- катепсины.

В настоящее время доказано, что лизосомальный протеолиз играет важную роль в деградации белков. На сегодняшний день известно около 50 лизосомальных гидролаз, но наибольшее значение уделяется аспартильным, сериновым, цистеиновым протеазам.

Катепсины по химической природе относятся к гликопротеинам, синтезируются в неактивном виде, активируются путем частичного протеолиза и принимают участие во внутриклеточном обмене белков, разрушая внутренние пептидные связи. На сегодняшний день известно об 11 лизосомальных

цистеиновых катепсинах. К ним относятся катепсины В, С, L, F, H, K, O, S, V, X, W. Большинство из них распространены в разных тканях и локализованы в лизосомах, где имеются оптимальные условия для действия этих ферментов (кислая среда).

Различают следующие группы катепсинов [22]:

В-подобные (В, X);

L-подобные (L, V, K, S, H);

F-подобные (F, W).

Их основное отличие заключается в длине консервативной последовательности и длине пропептида [22,108]. Так у В-подобных катепсинов консервативная последовательность GNFD [3], у L-подобных существует два высококонсервативных мотива ERF/MIN и GNFD. F-подобные катепсины: F-катепсин имеет консервативную последовательность CTSEF, а катепсин W имеет CTSEW мотив (Таблица 2).

Таблица 2 – Распространение и характеристика катепсинов

Катепсин	Место локализации	Роль в физиологических и патологических процессах
В –подобные		
В	В большинстве тканей	Участвует в патогенезе ревматоидного артрита, в апоптозе. Увеличенная экспрессия атипичными клетками [95,98,108].
X	В большинстве тканей	Увеличенная экспрессия при воспалении слизистой оболочки желудка [98].

L – подобные		
L	В большинстве тканей	Участвует в метаболизме эпидермиса, избыточной экспрессии в опухолевых тканях, в деградиционных изменениях соединительной ткани. [108].
V	Эпителиальные клетки вилочковой железы, роговицы, яичка	Участие в деградации белков [22].
K	Эпителиальные клетки бронхов, остеокласты	Участвует в ремоделировании костной ткани [98,228]. Обладает способностью к продукции эндостатинподобных фрагментов [35].
S	Дендритные клетки, макрофаги, В-клетки	Увеличенная экспрессия в лимфатической ткани [22], паренхиме легкого и сыворотке крови при раке легкого [97]; экспрессия в клетках астроцитомы при отсутствии в нормальных астроцитах [233].

Н	В большинстве тканей	Регуляция во внутриклеточном метаболизме белков, клеточной дифференцировке, обмене биологически активных веществ [171]. Вовлечен в раковую прогрессию [22].
F –подобные		
F	Макрофаги	Принимает участие в процессинге инвариантной цепи, презентации антигена класса II [22], повышенная экспрессия в отделяемом цервикального канала при опухолях [179].
W	Лимфоциты	Экспрессируется у больных с хроническим воспалением слизистой желудка [235].

Наиболее значимые из них и присутствующие во всех клетках организма являются лизосомальные цистеиновые катепсины (B, L, H).

Все цистеиновые катепсины схожи по строению. В их структуре имеются два домена, в центральной части активного центра располагаются 2 аминокислотных остатка. Эти остатки представлены цистеином и гистидином,

относящимся к разным доменам, формирующим каталитический участок. L домен имеет каталитический участок Cys 25, а R домен – His 159 (His 163 для катепсина L). Между доменами L (left) и R (right) расположен активный центр. L домен представлен тремя α спиралями, а R домен представлен β -цилиндрической структурой (Рисунок 9).

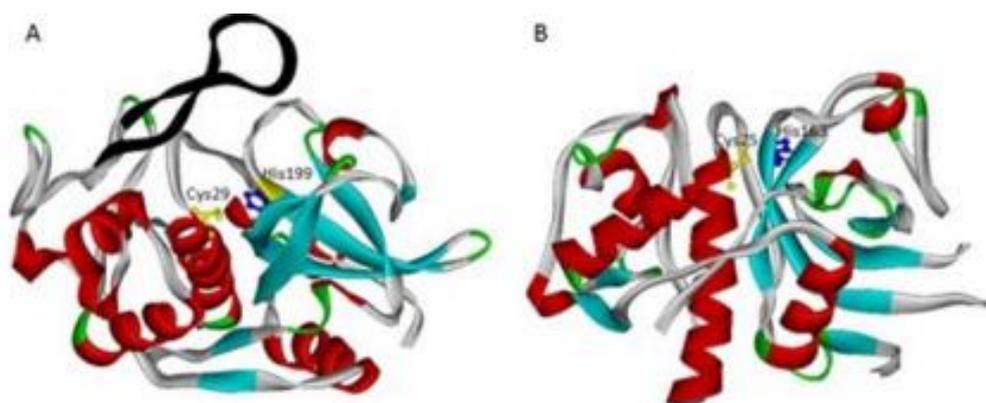


Рисунок 9 – Строение цистеиновых катепсинов

A – катепсин В; B – катепсин L (цит. по: Stoka V. Et al. ,2016) [218]

В ходе многолетних исследований было установлено, что цистеиновые катепсины обладают субстратной специфичностью. Они расщепляют пептидные связи, которые образованы остатками основных и гидрофобных аминокислот. Большая часть катепсинов проявляет эндопептидазную активность, но для некоторых катепсинов характерна и экзопептидазная активность (B, C, H, X). Катепсин H проявляет аминопептидазную активность [22,96], а катепсин B – карбоксипептидазную активность [108].

Лизосомальные катепсины синтезируются в форме препроферментов. N-концевой сигнальный пептид отщепляется в процессе переноса в эндоплазматический ретикулум с одновременным гликозилированием N-конца. Удаление сигнального пептида необходимо для правильного фолдинга фермента с последующим направлением его в лизосому. Этот процесс осуществляется с использованием специфического пути (маннозо-6-фосфат-рецепторный путь), который может ингибировать протеолитическую активность. [137, 205, 237]. Для

перехода профермента в активную форму должно произойти отщепление N-концевого пропептида (Рисунок 10).

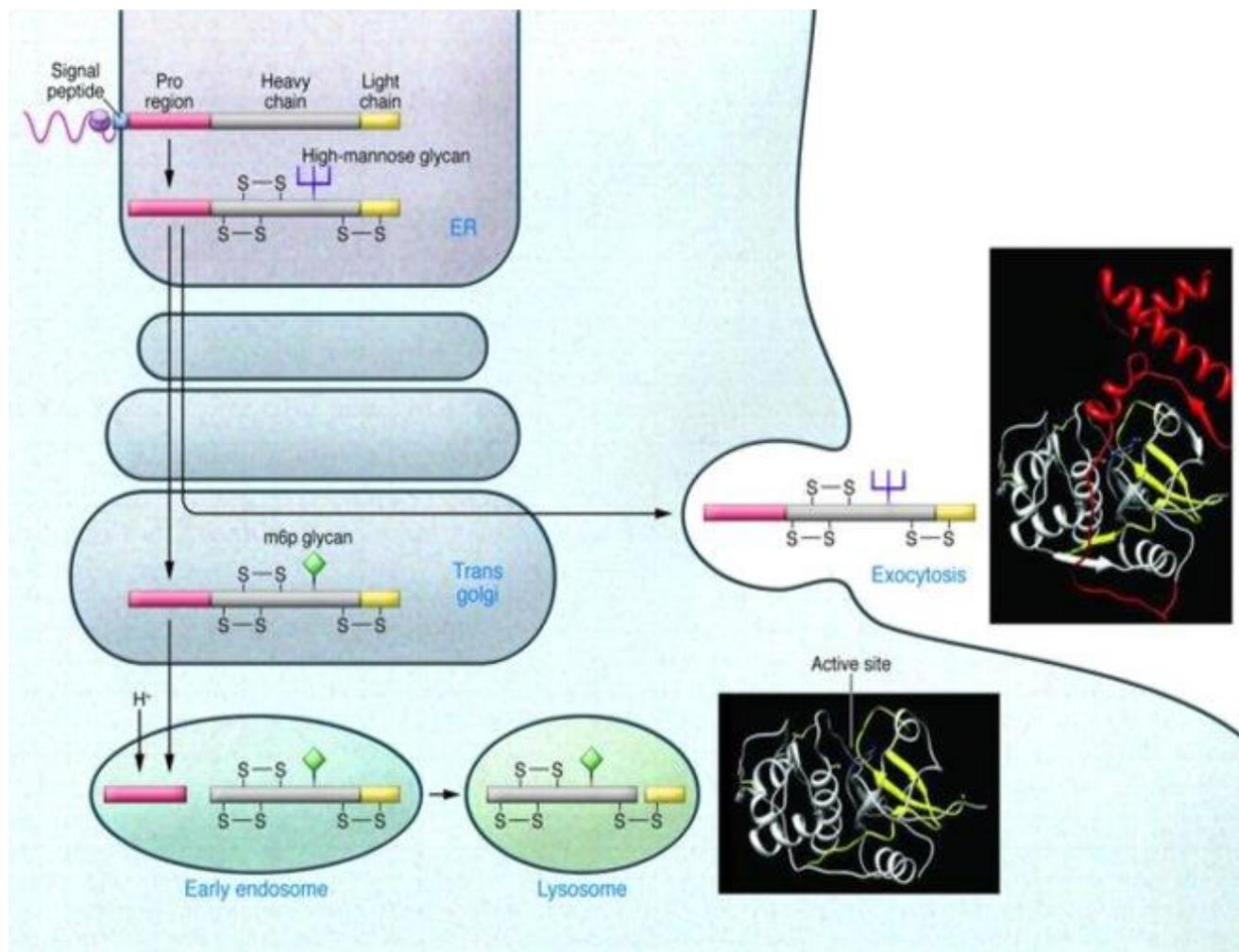


Рисунок 10 – Созревание катепсинов (цит. по: Rosendaal F.R., 2005) [204]

При изучении структуры прокатепсинов была выявлена пропептидная последовательность, которая располагается на поверхности молекулы [106, 222]. При прохождении сквозь «щель» активного центра пропептидная последовательность закрывает его и делает недоступным для связывания с субстратами. Для удержания пропептида на поверхности фермента имеются слабые гидрофобные и водородные связи. При формировании активной формы цистеиновых катепсинов, протеолитическое отщепление N-концевого пропептида катализируется другими цистеиновыми катепсинами, катепсином D или аутокаталитическим путем [108].

Первоначально считалось, что аутокаталитический процессинг цистеиновых катепсинов является бимолекулярным. На сегодняшний день есть доказательства, что данный механизм – это результат комбинированного действия моно- и бимолекулярных процессов.

Аутокаталитический процессинг возможен только для катепсинов с эндопептидазной активностью (В, Н, L, S, К). Процессинг экзопептидаз осуществляется эндопептидазами (катепсинами L и S) [144].

По окончании протеолитического процессинга регуляция цистеиновыми катепсинами может осуществляться эндогенными белковыми ингибиторами. Они не допускают связывание субстрата с активным центром фермента, т.е. выполняют роль конкурентных ингибиторов [108].

Значение рН среды также играет существенную роль в регуляции активности катепсинов. Для разных катепсинов характерен свой оптимум рН. Для катепсинов В, L, Н, К, V, Е это кислая среда, так как в нейтральной они очень неустойчивы [145-147]. Примером стабильной работы в нейтральной среде может служить катепсин S [161]. При снижении рН среды наступает необратимая денатурация катепсинов В, L, S [41]. Из-за этого нарушено связывание субстрата, пропептида, ингибиторов с ними [41,119,145].

1.5.1. Катепсин В

Катепсин В (С01.060) состоит из 2 доменов, которые стабилизированы шестью дисульфидными мостиками. Боковые цепи заряженных аминокислотных остатков Е 171, Е 36 направлены в полярную область между доменами, а также данная область определяет общую активность катепсина В [143]. Этот лизосомальный цистеиновый катепсин участвует в реакциях в качестве эндопептидазы, пептидилдипептидазы и карбоксипептидазы. У катепсина В имеется участок, который называется «окклюзионной петлей». Эта область осуществляет контроль доступа крупных субстратов к активному сайту и обеспечивает термическую стабильность катепсина В. Благодаря этому участку

катепсин В устойчив к действию эндогенных ингибиторов, таких, как цистатин С [143].

Закрытие активного центра фермента «окклюзионной петлей» происходит при низких значениях рН. Наблюдается снижение эндопептидазной активности из-за невозможного присоединения полипептида, но другие виды активности при этом сохраняются. Если значения рН поднимется, то петля открывает активный центр фермента и эндопептидазная активность возвращается.

Катепсин В участвует во многих клеточных процессах, таких как обновление белков, поддержание метаболизма клетки в норме. Активность катепсина В ингибируется цистатинами, стефинами, кининогенами. Для связывания ингибитора необходимо смещение «окклюзионной петли», чтобы произошло связывание с активным центром фермента. Из-за этого природные ингибиторы менее эффективны в отношении данного катепсина по сравнению с другими протеиназами семейства папаина. Катепсин В восприимчив к селективным необратимым ингибиторам СА-030, СА-074 [153]. Ингибиторы СА-074 и СА-074 Ме (производное метилового спирта СА-074) созданы на основе структуры Е 64 для улучшения перемещения в клетки. Ингибитор СА-074 Ме, также может ингибировать и катепсин L [81] (Рисунок 11).

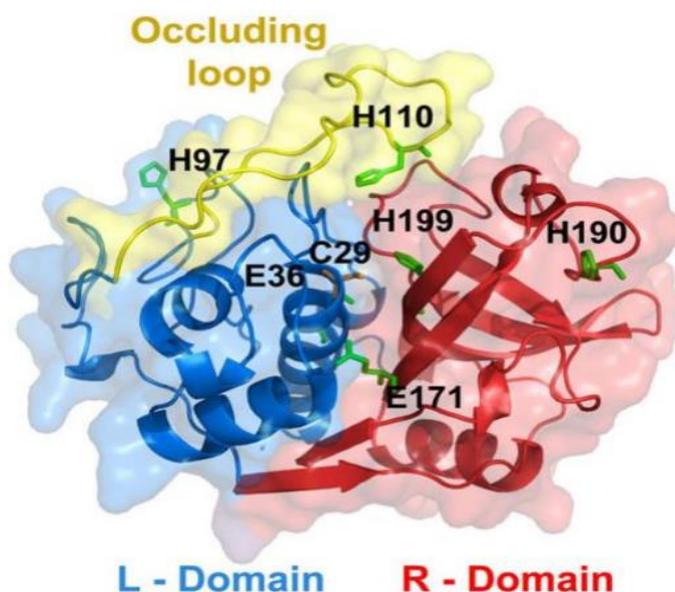


Рисунок 11 – Строение катепсина В (цит. по: Costa M. G. et al., 2010) [143]

1.5.2. Катепсин L

Катепсин L (C01.032) относится к лизосомальным цистеиновым протеазам и обладает эндопептидазной активностью, синтезируется в виде препроэнзима [22] и после посттрансляционных изменений попадает в лизосомы. В активном центре эндопептидаз имеется «реакционная щель», которая не ограничивается дополнительными структурами и не мешает присоединению длинных субстратных цепей. В кислой среде он активируется с помощью частичного протеолиза и транспортируется во внеклеточный матрикс. Аминокислотный состав этого катепсина схож на 80% с аминокислотным составом катепсина V, который встречается в вилочковой железе, яичках [163]. По литературным данным активность катепсина L повышается при раке предстательной железы [163] (Рисунок 12).

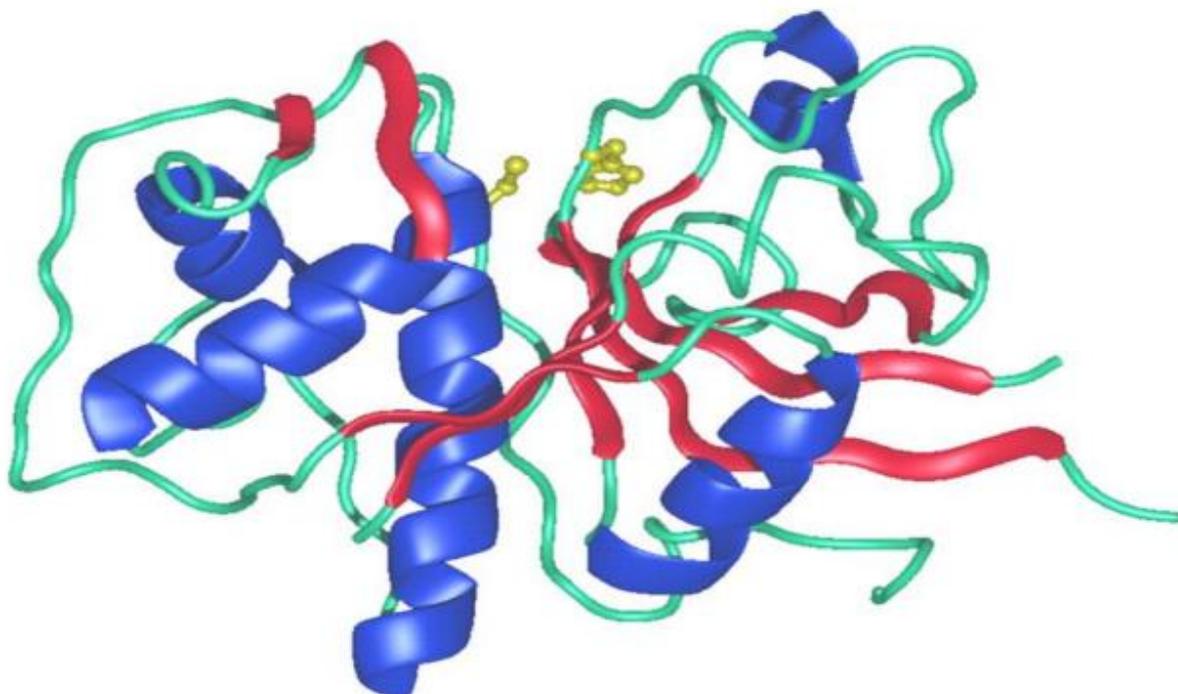


Рисунок 12 – Строение катепсина L (цит. по: Turk V. et al., 2012) [108]

На рисунке 12 α -спираль показана синим цветом, а β -спираль обозначена красным цветом.

1.5.3. Катепсин Н

Катепсин Н (C01.040) синтезируется на рибосомах в качестве препроэнзима [193]. После прохождения через ЭПР теряет пропептид и фермент становится активен. Для отщепления пропептида необходимы такие ферменты, как пепсин и катепсины других классов [22]. Отличительной особенностью данного катепсина является то, что он проявляет эндопептидазную и аминопептидазную активность. Оптимальное значение рН для работы этого катепсина 6,5-6,8. Аминопептидазная активность связана с наличием в его структуре остаточного октапептида EPQNCSAT, который называется «мини-цепь». При смещении рН среды в кислую сторону нарушается связь между пропептидом и активной частью молекулы [163]. По литературным данным катепсин Н может активироваться аутокаталитическим путем в кислой среде, но для этого необходимы гликозамины [35] (Рисунок 13).

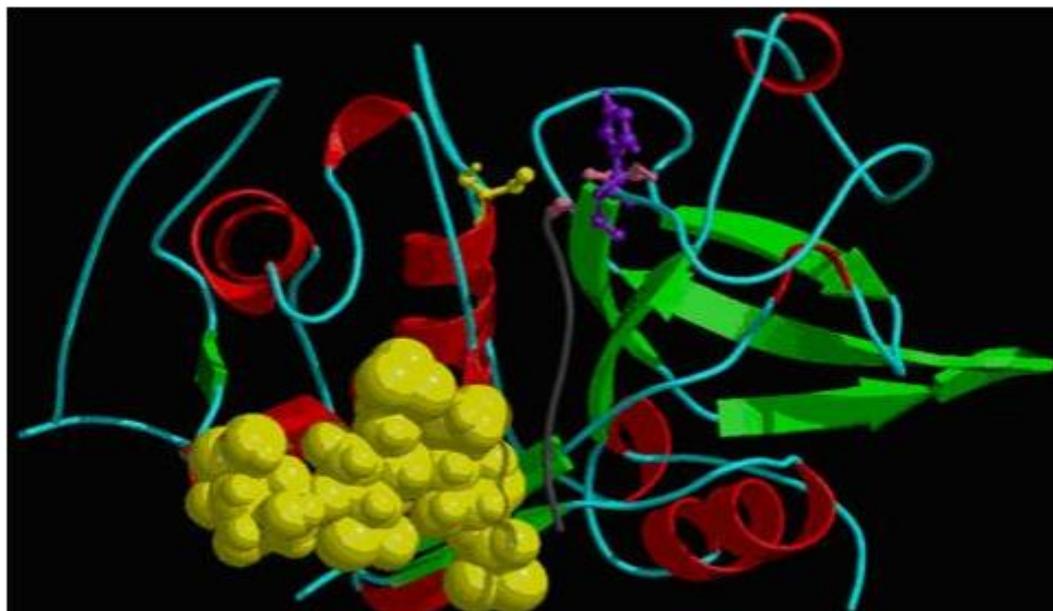


Рисунок 13 – Диаграмма Ричардсона – структура катепсина Н
(цит. по: Jevnikar, Z.et al., 2008) [153]

На рисунке изображен катепсин Н: α -спираль показана красным цветом, β -спираль обозначена зеленым цветом. Каталитические аминокислотные остатки

Cys 141 обозначены желтым цветом, His 281 обозначен фиолетовым цветом, Asp 301 обозначен розовым цветом. «Мини-цепь» показана серым цветом.

Активный центр катепсина Н перекрывает «мини-цепь» и соответствует сайтам S2 и S3 в типичных эндопептидазах. При удалении «мини-цепи» катепсин Н теряет аминокаталитическую активность, но эндопептидазная активность будет усиливаться.

В научной литературе [63,68,141,219] имеются данные об участии катепсинов в апоптозе. Клетки разрушаются вышедшими в цитозоль катепсинами, вследствие разрушения лизосомальной мембраны [68]. Участие катепсинов в апоптозе может протекать путем активации эффекторной каспазы 3 [94] или выступать в роли эффекторного фермента.

В первую очередь происходит разрушение белков цитозоля, например, это сигнальные белки Bcl-2 [68]. Также лизосомальные цистеиновые протеазы могут вызывать пермеабиллизацию мембран митохондрий путем активации белков Bid, Bak, Bax [89,91,231]. Катепсин В может вызвать конденсацию хроматина ядра [219]. В пермеабиллизации мембран могут участвовать и другие факторы, а именно активные формы кислорода [68], сигналы от рецепторов апоптоза [212], сфингозин [162], фосфолипаза A2 [68]. Активные формы кислорода запускают перекисное окисление липидов, которое пагубно влияет на лизосому, т.е. способствует её повреждению [53].

1.6. Влияние хронического простатита ШВ/синдрома хронической тазовой боли на мужскую фертильность

Хронический простатит является одним из самых распространенных заболеваний, встречающихся среди мужчин в возрасте от 20 до 40 лет, и составляет 8-35% от общей популяций [5,24,134]. Данная патология относится к заболеваниям, часто сопровождающимся нарушением репродуктивной функции и патозооспермии, проявляющейся в виде снижения концентрации и подвижности сперматозоидов, и появлением их патологических форм.

В Международной классификации болезней 10-го пересмотра хронический простатит имеет код N41.1.

В 1995 году Национальным исследовательским институтом здоровья США была предложена следующая классификация хронического простатита [21,24, 154].

I – острый бактериальный простатит

II – хронический бактериальный простатит

III А – воспалительный синдром хронической тазовой боли (наличие лейкоцитов более 10 в поле зрения в семенной жидкости/ третьей порции мочи/ секрете предстательной железы)

III В – невоспалительный синдром хронической тазовой боли (отсутствие лейкоцитов в семенной жидкости / третьей порции мочи/ секрете предстательной железы)

IV – асимптоматический простатит (подтверждается гистологически)

Основной процент – более 90 % случаев составляют пациенты с категориями III А и III В, как в России, так и за рубежом [24,186].

Причины возникновения ХП/СХТБ в настоящее время до конца не изучены [187].

К этиологическим факторам относятся:

1. Инфекция - наличие патологических микроорганизмов, не выделяющихся стандартными методами;

2. Детрузорно-сфинктерная дисфункция – уретропростатический рефлюкс мочи, дисфункциональное мочеиспускание;

3. Иммунологический дисбаланс – повышение уровня цитокинов;

4. Интерстициальный цистит;

5. Неврологические нарушения [20,24,72,187].

Отсутствие единого этиологического фактора, позволяет отнести ХП/СХТБ к мультифакторным заболеваниям [24].

Определяющую роль в ХП/СХТБ могут играть врожденные особенности кровоснабжения предстательной железы. Известно, что регуляция сосудистого

тонуса осуществляется при участии активных форм кислорода, которые в физиологических концентрациях регулируют сперматогенез, подвижность сперматозоидов, но при их избыточном накоплении происходит повреждение мембраны клеток и генетического материала.

Данная проблема мало изучена и требует поиска биохимических маркеров.

1.7. Роль варикоцеле в патогенезе развития мужского бесплодия

Варикоцеле отводится особое место в мужском бесплодии, так как, несмотря на широкую распространенность данной патологии, влияние варикоцеле на репродуктивное здоровье мужчин до сих пор вызывает много споров [100,129]. Под этим термином понимают патологическое расширение внутренней сперматической вены, формирующей лозовидное сплетение кровеносных сосудов мошонки [4,138,183,226,236].

В Международной классификации болезней 10-го пересмотра варикоцеле имеет код I86.1.

Среди мужчин, страдающих бесплодием, варикоцеле встречается в 21-39%, а частота распространения данной патологии в мужской популяции составляет 8-22% [2].

У мужчин с олигоастенозооспермией варикоцеле встречается чаще, чем среди мужчин с нормальными показателями эякулята. Механизмы нарушения сперматогенеза при варикоцеле до настоящего времени изучены недостаточно. Не одна из предложенных версий не объясняет патогенез данного заболевания в полном объеме.

Существуют следующие механизмы развития варикоцеле:

1. нарушение кровоснабжения ипсилатерального яичка из-за повышения венозного давления, что приводит к атрофии органа;
2. повышение температуры мошонки;
3. окислительный стресс;
4. гормональный дисбаланс;

5. аутоиммунные механизмы;

6. несостоятельность клапанов сперматической вены [34].

В большинстве случаев варикоцеле возникает с левой стороны, что вероятно связано с анатомическими особенностями:

- различие в кровотоке с левой и с правой стороны;
- длине левой и правой семенных вен;
- отсутствие венозных клапанов слева.

Ввиду разнообразия клиники данного заболевания может быть задействовано сразу несколько патогенетических механизмов [126].

Связь варикоцеле с бесплодием основывается на 3-х факторах:

1. Чаще всего бесплодие возникает у мужчин с варикоцеле;
2. При варикоцеле уменьшается объем яичек и снижается качество спермы, развивается олиготератоастенозооспермия;
3. Улучшение параметров эякулята после оперативного лечения.

У мужчин с варикоцеле и бесплодием выявляется более высокий уровень активных форм кислорода в спермоплазме, чем у мужчин с нормальным репродуктивным здоровьем [132].

Несмотря на большое количество научных исследований, единого мнения о влиянии варикоцеле на фертильность мужчин не сформировано и требует дополнительных исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии со сформулированной целью и задачами был разработан следующий дизайн исследования.

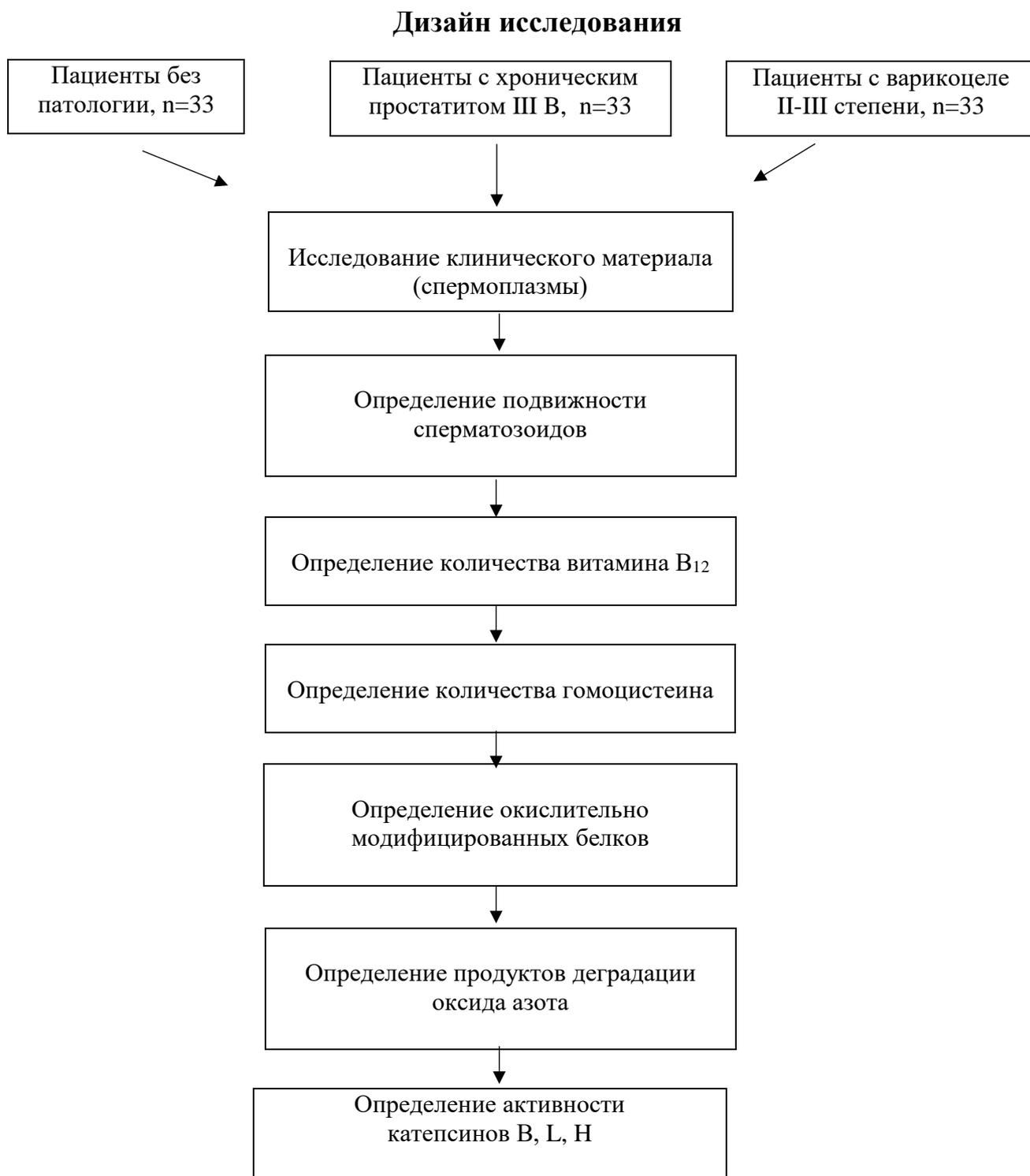


Рисунок 14 – Дизайн исследования

Базой исследования стала кафедра биологической химии Рязанского государственного медицинского университета.

Исследование одобрено на заседании ЛЭК ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России от 11 мая 2021 года. Выписка из протокола № 11.

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

Материалом для исследования явилась спермоплазма, полученная от 33 пациентов с диагнозом «ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией» и 33 пациентов с диагнозом «варикоцеле II-III степени с сопутствующей астенозооспермией», которые проходили обследование в КДЛ ГБУ РО «Городская клиническая больница № 8» г. Рязани в 2021 году.

Включение пациентов в исследование осуществлялось после их добровольного информированного согласия. Из исследования были исключены пациенты с заболеваниями, передаваемыми половым путем (гонорея, трихомониаз, хламидиоз, микоплазмоз, сифилис, гепатиты В, С, наличием диагностического уровня антител к ВИЧ), а также с сопутствующими заболеваниями, для которых доказано участие лизосомальных цистеиновых протеиназ (сахарный диабет, атеросклероз, артриты), а также веганы и вегетарианцы.

Всем пациентам, включённым в исследование, определялся уровень тестостерона и пролактина. При исследовании результаты у всех обследуемых были в пределах референтных значений (тестостерон – 12,1-38,3 нмоль/л, пролактин – ≤ 500 МЕ/л).

Все пациенты получали сбалансированное питание, которое обеспечивало нормальное функционирование организма.

Пациентам с варикоцеле II-III степени с сопутствующей астенозооспермией медикаментозное лечение не проводилось. При ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией назначались нестероидные противовоспалительные препараты для купирования болевого синдрома. За 14 дней до исследования эякулята все лекарственные препараты отменялись.

2.1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Разделение пациентов на группы осуществлялось с использованием данных (Таблица 3).

Таблица 3 – Характеристика групп пациентов (M±s)

Группа пациентов	Диагноз	Количество пациентов	Средний возраст пациентов, лет	Средний рост, см	Средний вес, кг	% курящих от общего кол-ва пациентов в группе
Группа 1	Доноры	33	27±5,4	175,8±4,2	77,6±3,4	30%
Группа 2	ХП/СХТБ	33	30±3,1	179,3±8,5	83,2±6,1	38%
Группа 3	Варикоцеле	33	25±6,8	178,1±5,5	81,0±4,5	35%

В контрольную группу (№ 1) вошли 33 пациента с нормозооспермией без нарушения репродуктивной функции, сопоставимых по возрасту с группой № 2 и № 3.

В группу № 2 вошли 33 пациента с ХП/СХТБ с астенозооспермией.

У них присутствовали клиничко-лабораторные признаки ХП/СХТБ:

- отсутствие заболеваний, передающихся половым путем;
- наличие лейкоцитов в простатическом соке;
- отсутствие патогенных микроорганизмов при обследовании стандартными культуральными методами;
- изменение ткани простаты при ультразвуковом исследовании;
- наличие болевого и дизурического симптомов;

- нарушение эректильной функции;
- наличие у пациентов в анамнезе с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени снижения фертильности, бесплодие;
- отсутствие у обследуемых олигозооспермии, т.е. концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята была не менее 20×10^6 мл, а общее количество сперматозоидов 40×10^6 , что соответствует референтным значениям эякулята ВОЗ (5-е издание, 2012 год);
- сопутствующая астенозооспермия по результатам лабораторного обследования эякулята, проведенного в соответствии с рекомендациями ВОЗ (5-е издание, 2012 год);
- отсутствие у обследуемых хронических заболеваний, которые могут способствовать снижению фертильности.

В группу № 3 вошли 33 пациента с варикоцеле II и III степени и астенозооспермией.

Оценку проявлений варикоцеле проводили по степени пальпации предложенной M.D. Vomalasky et al. 1993:

I степень – увеличение лозовидного сплетения не визуализируется и пальпируется только при пробе Вальсальвы.

II степень – увеличение лозовидного сплетения пальпируется отчетливо.

III степень – увеличение лозовидного сплетения определяется визуально.

- ультразвуковое исследование органов мошонки с доплером;
- отсутствие у обследуемых олигозооспермии, т.е. концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята была не менее 20×10^6 мл, а общее количество сперматозоидов 40×10^6 , что соответствует референтным значениям эякулята ВОЗ (5-е издание, 2012 год);
- сопутствующая астенозооспермия по результатам лабораторного обследования эякулята, проведенного в соответствии с рекомендациями ВОЗ (5-е издание, 2012 год);
- отсутствие у обследуемых хронических заболеваний, которые могут способствовать снижению фертильности;

- снижение фертильности, бесплодие.

Постановка диагноза всем пациентам проводилась в медицинском центре «Гармония» города Рязани, а исследование спермограммы в клинко-диагностической лаборатории ГБУ РО «ГКБ№ 8». Пациентам группы № 2 и № 3 был поставлен диагноз в соответствии с диагностическими рекомендациями Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), утвержденной ВОЗ.

2.2. Получение материала для исследования

2.2.1. Сбор эякулята

Материалом для исследования явился эякулят. После подписания добровольного информированного согласия пациентами и предварительной подготовки перед исследованием спермограммы, полового воздержания и исключения употребления алкоголя в любых количествах, в течение 2-7 дней, эякулят собирался однократно, методом мастурбации в клинко-диагностической лаборатории ГБУ РО «ГКБ № 8» в одноразовый пластиковый контейнер с крышкой, предназначенный для сбора эякулята. Материал, из которого изготавливался контейнер, не содержал токсических веществ, влияющих на подвижность сперматозоидов (регистрационное удостоверение № РЗН 2016/4686).

2.2.2. Подсчет подвижности сперматозоидов в эякуляте

Исследование спермограммы проводилось в соответствии с руководством ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека, 5-е издание, 2012 год. Первый этап исследования включал оценку макроскопических параметров спермы: объем, разжижение, вязкость, цвет, запах, рН, гемоспермия,

лейкоспермия. Далее проводилось исследование подвижности сперматозоидов на спермоанализаторе АФС-500-2, Россия.

Ход определения. Для подсчета подвижности сперматозоидов эякулят добавляется в специальную стеклянную камеру (глубина камеры 200 мкм) и под действием капиллярных сил заполняется рабочая область. Интенсивность света в рабочей области камеры модулирована периодической функцией. При движении клетки вдоль рабочей области камеры возникают периодические колебания оптической плотности. Частота этих колебаний зависит от скорости движения клетки и периода модуляции света. Колебания интенсивности света регистрируются фотоприемником, затем поступают в аналого-цифровой преобразователь и далее в компьютер. После спектрального анализа сигнала, по его мощности в заданном диапазоне частот определяется количество клеток, движущихся в заданном диапазоне скоростей. Анализ флуктуаций оптической плотности, вызванных движением клеток через оптический канал, позволяет также определить концентрацию клеток в образце.

Глубина камеры выбрана достаточно большой, чтобы сперматозоиды двигались, не соприкасаясь со стенками камеры. Это позволяет регистрировать движение гиперактивных клеток. Кроме того, так как в основном клетки двигаются параллельно стенкам камеры, нет необходимости корректировать результаты анализа их подвижности с учетом третьего измерения. Результаты выражались в процентах.

2.2.3. Подготовка спермоплазмы

Для получения спермоплазмы образец спермы, оставшийся после проведения семиологического анализа, центрифугировали в течение 10 мин при скорости 1000 об/мин. Активность катепсинов изучали в незамороженной спермоплазме. Осадок отделяли и хранили спермоплазму при температуре – 20°C до проведения анализа [71].

2.3. Определение витамина В₁₂

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

Принцип метода. Определение витамина В₁₂ основано на конкурентном методе ИФА. Микропланшет, входящий в состав набора, сорбирован моноклональными антителами, специфичными к цианкобаламину. Конкурентная реакция происходит между цианкобаламином, меченным биотином, немеченным цианкобаламином (в образцах или контроле) и сорбированными антителами, специфичными к цианкобаламину. Не связавшийся конъюгат после инкубации удаляют отмывкой. Затем в каждую лунку планшета добавляют авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP), и инкубируют. Количество связанного конъюгата пероксидазы хрена обратно пропорционально концентрации витамина В₁₂ в образце. После добавления ТМБ интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации витамина В₁₂ в образце.

Ход определения. В каждую лунку планшета добавляли по 50 мкл стандарта или образца и по 50 мкл рабочего раствора детектирующего реагента А. После этого планшет встряхивали в шейкере, заклеивали плёнкой для планшета и инкубировали 1 час при 37°C. После инкубации удаляли жидкость и промывали лунки 3 раза. Затем добавляли 100 мкл рабочего раствора детектирующего реагента В. Инкубировали 30 минут при 37°C. После этого удаляли жидкость и промывали лунки 5 раз. Далее добавляли 90 мкл ТМБ. Инкубировали 10-20 минут при 37°C. Затем добавляли 50 мкл стоп-реагента, цвет жидкости в лунках изменялся на жёлтый. Измерения производились на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (microplate reader) (Awareness technology Inc. Palm City, FL 34990, USA). Сразу считывали результат при длине волны 450 нм. Результаты выражали в пг/мл.

2.4. Определение гомоцистеина

Определение гомоцистеина проводили методом конкурентного ИФА с использованием набора фирмы Cloud-Clone Corp (Китай). Данный набор предназначен для количественного определения гомоцистеина в любых биологических жидкостях, в том числе, в спермоплазме.

Принцип метода. Определение гомоцистеина основано на конкурентном методе ИФА. Микропланшет, входящий в состав набора, сорбирован моноклональными антителами, специфичными к гомоцистеину. Конкурентная реакция происходит между гомоцистеином, меченным биотином, немеченным гомоцистеином (в образцах или контроле) и сорбированными антителами, специфичными к гомоцистеину. После инкубации не связавшийся конъюгат удаляют отмывкой. Затем авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP), добавляют в каждую лунку планшета и инкубируют. Количество связанного конъюгата пероксидазы хрена обратно пропорционально концентрации гомоцистеина в образце. После добавления ТМБ интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации гомоцистеина в образце.

Ход определения. Добавляли в каждую лунку планшета по 50 мкл стандарта или образца и по 50 мкл рабочего раствора детектирующего реагента А. После этого встряхивали в шейкере, заклеивали плёнкой для планшета и инкубировали 1 час при 37°C. Затем удаляли жидкость, промывали лунки 3 раза и добавляли 100 мкл рабочего раствора детектирующего реагента В. Инкубировали 30 минут при 37°C. После этого удаляли жидкость и промывали лунки 5 раз. Далее добавляли 90 мкл ТМБ. Инкубировали 10-20 минут при 37°C и добавляли 50 мкл стоп-реагента. Жидкость в лунках становилась жёлтого цвета. Измерения производились на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (microplate reader) (Awareness technology Inc. Palm City, FL 34990, USA). Результат считывали сразу при длине волны 450 нм и выражали их в нг/мл.

2.5. Оценка показателей оксидативного/нитрозативного стресса

2.5.1. Оценка уровня спонтанной окислительной модификации белка

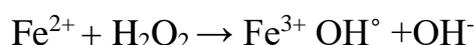
Оценка интенсивности окислительной модификации белков в спермоплазме проводилась по методу R.L. Levine [111] в модификации Е.Е. Дубининой [57].

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

Ход определения. В контрольные пробы для осаждения белка к 0,1 мл спермоплазмы добавляли 1 мл 20 % раствора ТХУ и 1 мл 2М раствора HCl, в опытные пробы – 1 мл 0,01 М раствора ДНФГ в 2М растворе HCl. Пробирки ставили на 60 минут в тёмное место. Затем пробы центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об/мин и проводили 3-х кратную отмывку полученных осадков от остатков ДНФГ смесью 96% раствора этилового спирта и этилацетата (1:1). Осадки высушивали, растворяли в 8М растворе мочевины.

2.5.2. Оценка уровня металл-катализируемой окислительной модификации белка

Оценка интенсивности металл-катализируемой (индуцированной) окислительной модификации белков в спермоплазме проводилась по методу R.L. Levine [111] в модификации Е.Е. Дубининой [57] после инициации окислительных процессов по реакции Фентона:



Оценка индуцированной ОМБ заключалась в следующем:

1) добавлением в реакционную смесь ионов металла (Fe^{2+}) [54] с целью дополнительного образования карбонильных производных белков;

2) оценка уровня карбонильных производных, образовавшихся под действием активных форм кислорода на 4 длинах волн.

Затем пробы центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об/мин и проводили 3-х кратную отмывку полученных осадков от остатков ДНФГ смесью 96% раствора этилового спирта и этилацетата (1:1). Осадки высушивали, растворяли в 8М растворе мочевины. Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов измеряли на спектрофотометре «СФ-26» для АДНФГ на длине волны 356, 370 нм, а для КДНФГ на длине волны 430, 530 нм. Расчет содержания 2,4 ДНФГ в спермоплазме выражали в единицах оптической плотности на мл спермоплазмы.

2.5.3. Оценка резервно-адаптационного потенциала

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

2.5.4. Определение концентрации конечных метаболитов оксида азота

Определение концентрации стабильных метаболитов NO (нитритов и нитратов) проводили фотометрическим методом в модификации В.А. Метельской [46].

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

Ход определения. В каждую лунку планшета вносили по 0,2 мл исследуемой спермоплазмы и 0,4 мл этилового спирта для депротенинизации,

центрифугировали 20 минут при 3000 об/мин. Затем в каждую лунку планшета добавляли по 80 мкл супернатанта, 80 мкл хлорида ванадия и 80 мкл реактива Грисса. Измерения производились на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 3200 (microplate reader) (Awareness technology Inc. Palm City, FL 34990, USA). Результаты выражали в мкмоль/л.

2.6. Определение активности катепсинов В, L и Н в спермоплазме

Определение активности катепсинов В, L и Н проводили спектрофлуориметрическим методом по Barrett и Kirschke [88] с измерением флюоресцирующего продукта реакции 7-амидо-4-метилкумарина, образующегося при расщеплении специфических флюорогенных субстратов: Na-карбобензоксигенин-аргинин-7-амидо-4-метилкумарин (Na-CBZ-Arg-Arg-7-амидо-4-метилкумарин), «Sigma», USA) для катепсина В, Na-карбобензоксигенин-L-фенилаланил-аргинин-7-амидо-4-метилкумарина (N-CBZ-Phe-Arg-7-амидо-4-метилкумарин, Sigma», USA) для катепсина L, аргинин-7-амидо-4-метилкумарина (Arg-7-амидо-4-метилкумарин, «Sigma», USA) для катепсина Н.

Принцип метода - количественное определение 7 - амидо - 4 - метилкумарина, образующегося в результате энзиматического гидролиза пептидной связи в соответствующем субстрате.

Ход определения. К 0,1 мл спермоплазмы добавляли 0,4 мл субстратно – буферного раствора, содержащего 20 мкл соответствующего субстрата, 8 мкл дитиотриетол и 2 мкл ЭДТА в буферном растворе с соответствующим значением рН, проинкубированного в течение 2-х минут при 37⁰С. Полученную реакционную смесь инкубировали в течение 60 минут при температуре 37⁰С, после чего реакцию останавливали добавлением 2,0 мл раствора холодного 0,1М ацетатного буфера с рН 4,0. Контрольная проба содержала те же компоненты, за исключением исследуемого материала с изучаемым ферментом, который вносился в конце инкубации непосредственно после добавления ацетатного буфера рН 4,0.

Активность катепсинов определяли на спектрофлуориметре Shimadzu RF-6000 производства "Shimadzu Corporation"(Япония), при $\lambda=360$ нм (возбуждение) и $\lambda=440$ нм (эмиссия) и выражали в нмоль 7-амидо-4-метилкумарина/ч \times л для спермоплазмы.

2.7. Определение содержания белка в спермоплазме биуретовым методом

Измерение концентрации белка в спермоплазме осуществлялось биуретовым методом с использованием коммерческих наборов производства фирмы «Mindray» (Китай). Данный набор предназначен для количественного определения общего белка биуретовым методом в биологических жидкостях.

Для решения вопросов преемственности использования в исследовании тест-системы, предназначенной для определения концентрации общего белка в сыворотке или плазме крови, руководствовались «ГОСТ Р ИСО 15189-2015 Лаборатории медицинские. Частные требования и компетентности».

Принцип метода - в щелочном растворе (рН>12) при взаимодействии двухвалентной меди с пептидными связями белка, образуется биуретовый комплекс сине-фиолетового цвета. Интенсивность цвета прямо пропорциональна содержанию белка.

Ход определения. К 1000 мкл биуретового реактива добавляли 20 мкл спермоплазмы, тщательно перемешивали при температуре 37°C. Через 10 минут измеряли оптическую плотность. Исследование проводили на биохимическом анализаторе BS 120 фирмы (Mindray, Китай). Полученные результаты выражали в г/л.

2.8. Методы статистической обработки полученных результатов

Полученные данные обрабатывались с применением компьютерных программ Microsoft Office Excel 2016 и Statistica 26.0 (StatSoft Inc., США), работающих в операционной среде «Windows». Нормальность распределения

выборки оценивалась по критерию Колмогорова-Смирнова. Для всех значений выборка оказалось непараметрической. Сравнение множества групп проводилось с помощью непараметрического H-критерия Крускала – Уоллеса. Затем проводили апостериорное множественное сравнение по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Многофакторный корреляционный анализ и корреляционный анализ с определением коэффициента Спирмена (r). проводили в программе Statistica 26.0. Многофакторный регрессионный анализ проводили в программе Microsoft Office Excel 2016 при помощи пакета анализа MS EXCEL для построения множественной линейной регрессионной модели. Различия между показателями считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Макроскопическое и микроскопическое исследование эякулята у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией

При макро- и микроскопическом исследовании эякулята определяли его объем, цвет, запах, время разжижения, рН, количество эритроцитов, лейкоцитов, эпителия, концентрацию сперматозоидов в 1 мл, общее количество сперматозоидов в эякуляте. Результаты представлены в таблице (Таблица 4).

Таблица 4 – Макроскопическое и микроскопическое исследование эякулята у пациентов ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией и у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией (M±s)

Показатель	Контрольная группа	Пациенты с ХП/СХТБ	Пациенты с варикоцеле II-III степени	Референтные значения
Объем	3,5±0,5	3,0±0,8	2,8±0,6	2,0 – 5,0
Разжижение	до 60 минут	до 60 минут	до 60 минут	до 60 минут
Вязкость	0,3±0,2	1,0±0,7	1±0,2	До 2 см
Цвет	бело-сероватый	бело-сероватый	бело-сероватый	бело-сероватый
Запах	запах цветов каштана	запах цветов каштана	запах цветов каштана	запах цветов каштана
рН	7,5±0,2	7,4±0,1	7,8±0,2	7,2-8,0
Эритроциты	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
Лейкоспермия	ед. в п/з	ед. в п/з	3-5 в п/з	до 3-5 в п/з
Эпителий	отсутствует	ед. в п/з	ед. в п/з	ед. в п/з
Количество сперматозоидов в 1 мл	70 млн/мл	35 млн/мл	15 млн/мл	15 млн./мл и более
Количество сперматозоидов в эякуляте	90 млн	70 млн	35 млн	39 млн и более

У пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II-III степени, с сопутствующей астенозооспермией все указанные показатели в таблице соответствовали референтным значениям.

3.2. Подсчет подвижности сперматозоидов в эякуляте у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией

По данным ВОЗ подвижность сперматозоидов является одним из основных и значимых критериев мужской фертильности, так как астенозооспермия препятствует зачатию.

Согласно ВОЗ по подвижности сперматозоиды можно разделить на 4 категории:

А – быстрое поступательное движение по критериям ВОЗ (5-е издание,2012) не менее 25%;

В – медленное, вялое поступательное движение;

С – непоступательное движение (колебательное или маятникообразное) по критериям ВОЗ (5-е издание,2012) $\leq 5\%$;

Д – неподвижные сперматозоиды.

При изучении подвижности сперматозоидов в эякуляте учитывали суммарное количество сперматозоидов категории А, В, С у каждого пациента. В норме подвижность сперматозоидов согласно ВОЗ более или равна 40%.

У пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией (группа 2) подвижность сперматозоидов была снижена и составила $15\pm 3\%$, что оказалось статистически значимым по сравнению с контрольной группой, а у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией (группа 3) подвижность сперматозоидов составила $8\pm 2\%$, что оказалось тоже статистически значимым по сравнению с контрольной группой. В контрольной группе подвижность составила $62\pm 3\%$ (Рисунок 15).

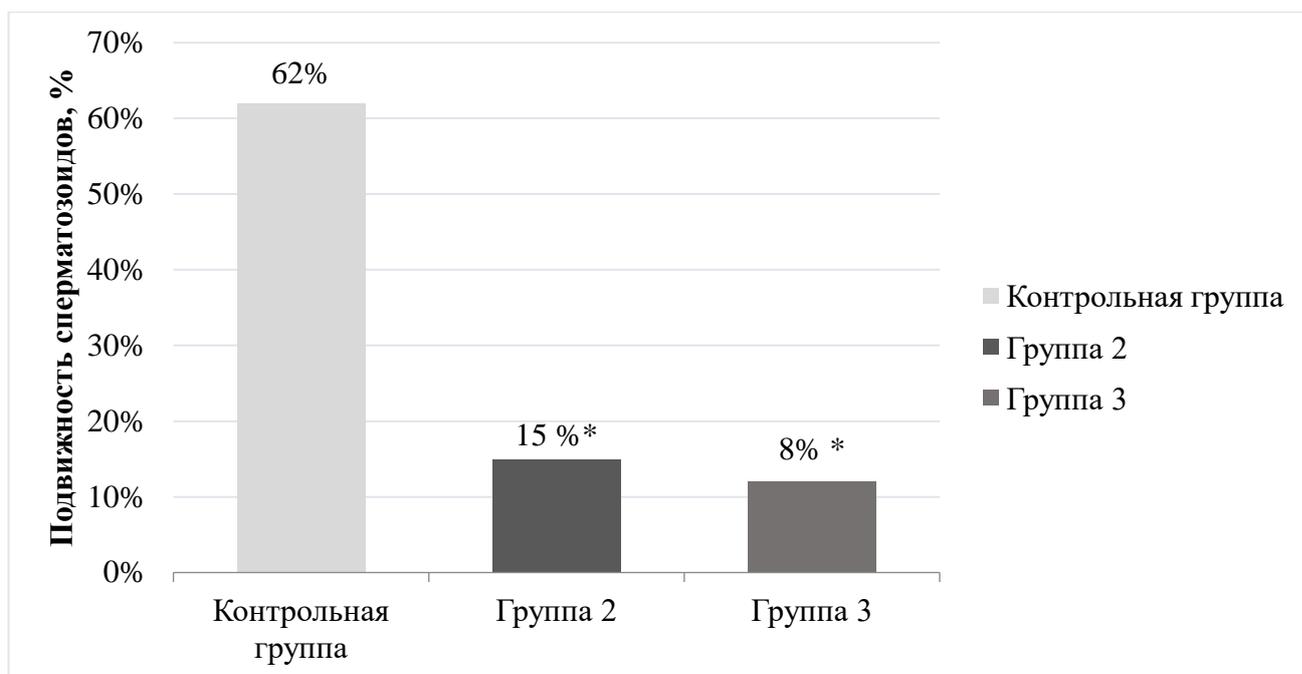


Рисунок 15 – Подвижность сперматозоидов в эякуляте пациентов, %

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

3.3. Определение концентрации витамина В₁₂ у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли и с сопутствующей астенозооспермией

При обработке полученных данных было выявлено статистически значимое снижение концентрации витамина В₁₂ в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией (группа 2) по сравнению с контрольной группой. Концентрация витамина В₁₂ составляет 217,7 пг/мл [91,4;412,0] ($p=0,001$) (Рисунок 16).

Нами был проведен корреляционный анализ между подвижностью сперматозоидов и концентрацией витамина В₁₂ в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией, при проведении анализа выявлена положительная корреляционная взаимосвязь средней степени выраженности $r=0,69$ ($p=0,001$) между подвижностью сперматозоидов и концентрацией витамина В₁₂ у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией (Рисунок 17).

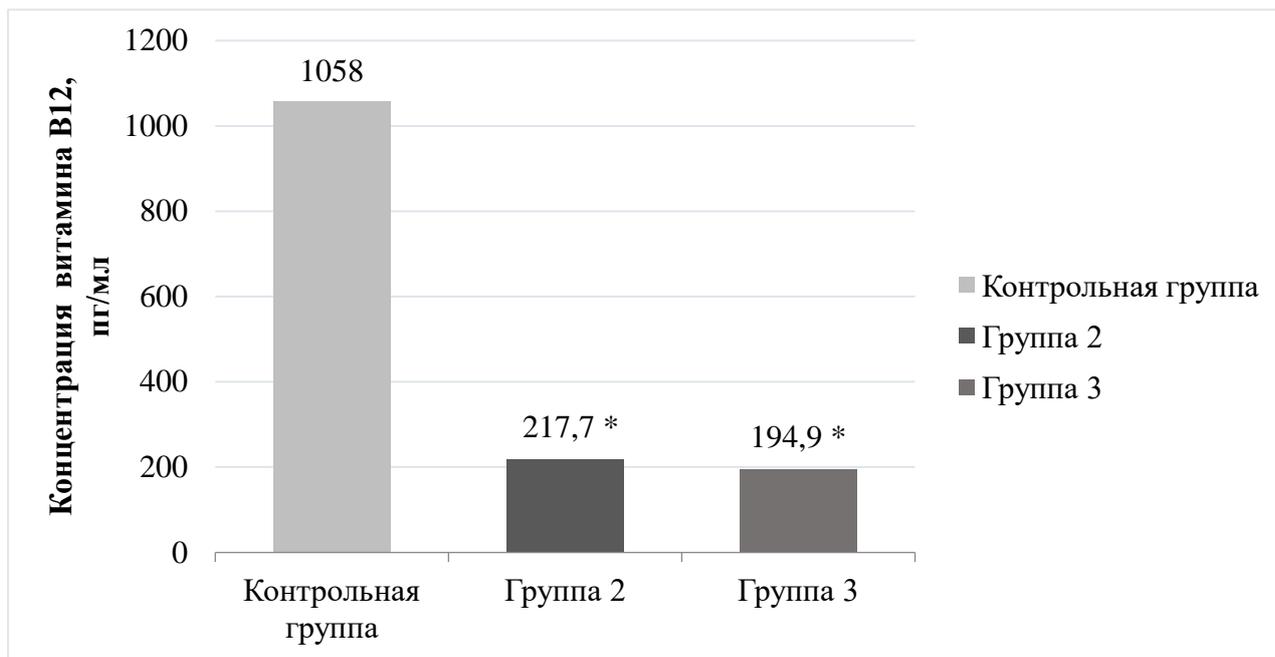


Рисунок 16 – Концентрация витамина B₁₂ в спермоплазме пациентов, пг/мл

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

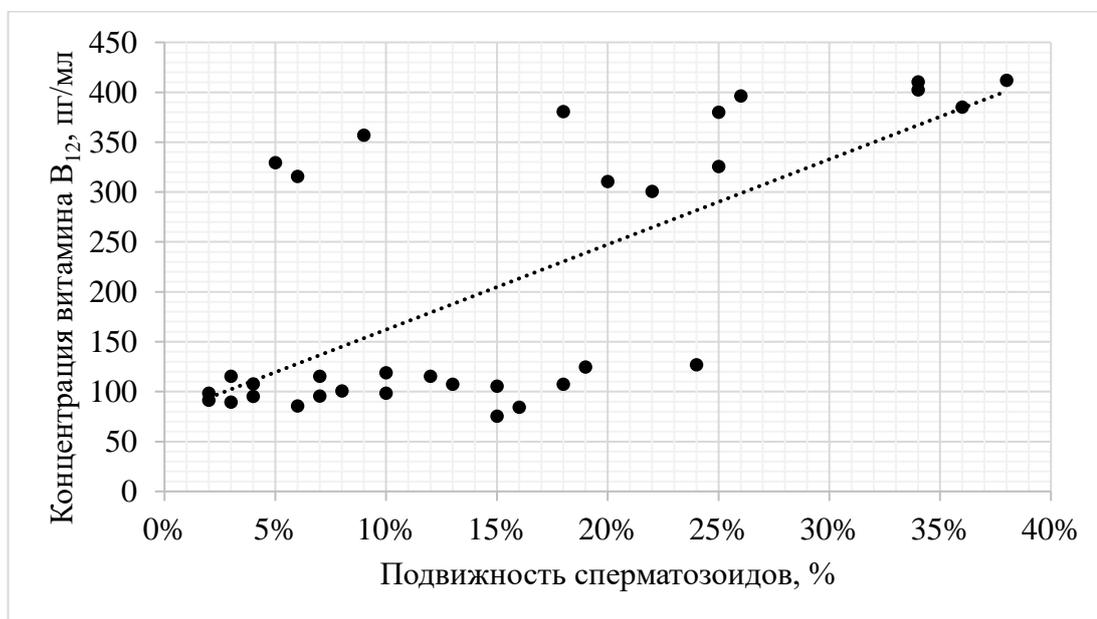


Рисунок 17 – Зависимость подвижности сперматозоидов в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией от концентрации витамина B₁₂

3.4. Определение концентрации витамина В₁₂ у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией

У пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией (группа 3) также отмечалось снижение концентрации витамина В₁₂ в спермоплазме и составило 194,9 [86,4;380,0] пг/мл ($p=0,002$), что в 5,4 раза ниже по сравнению с контрольной группой.

При проведении корреляционного анализа у пациентов без нарушения репродуктивной функции была выявлена положительная корреляционная взаимосвязь высокой степени выраженности $r=0,80$ ($p=0,01$) между подвижностью сперматозоидов и концентрацией витамина В₁₂ (Рисунок 18).

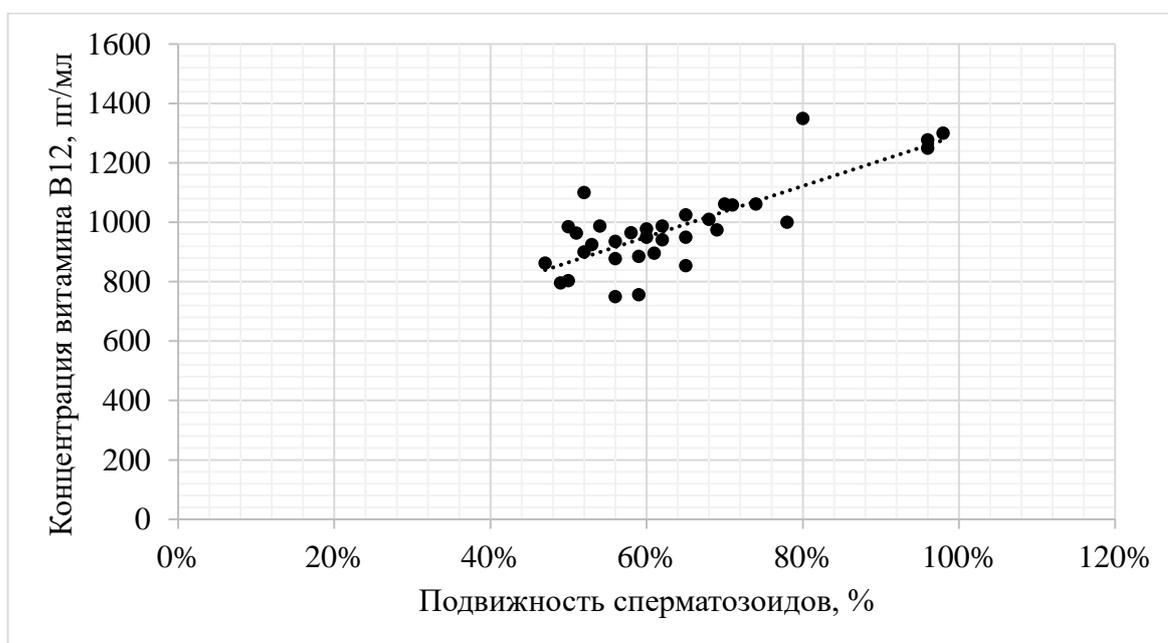


Рисунок 18 – Зависимость подвижности сперматозоидов в спермоплазме у обследуемых контрольной группы от концентрации витамина В₁₂

При проведении корреляционного анализа между подвижностью сперматозоидов и концентрацией витамина В₁₂ у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией выявлена положительная корреляционная взаимосвязь средней степени выраженности $r=0,69$ ($p=0,001$) (Рисунок 19).

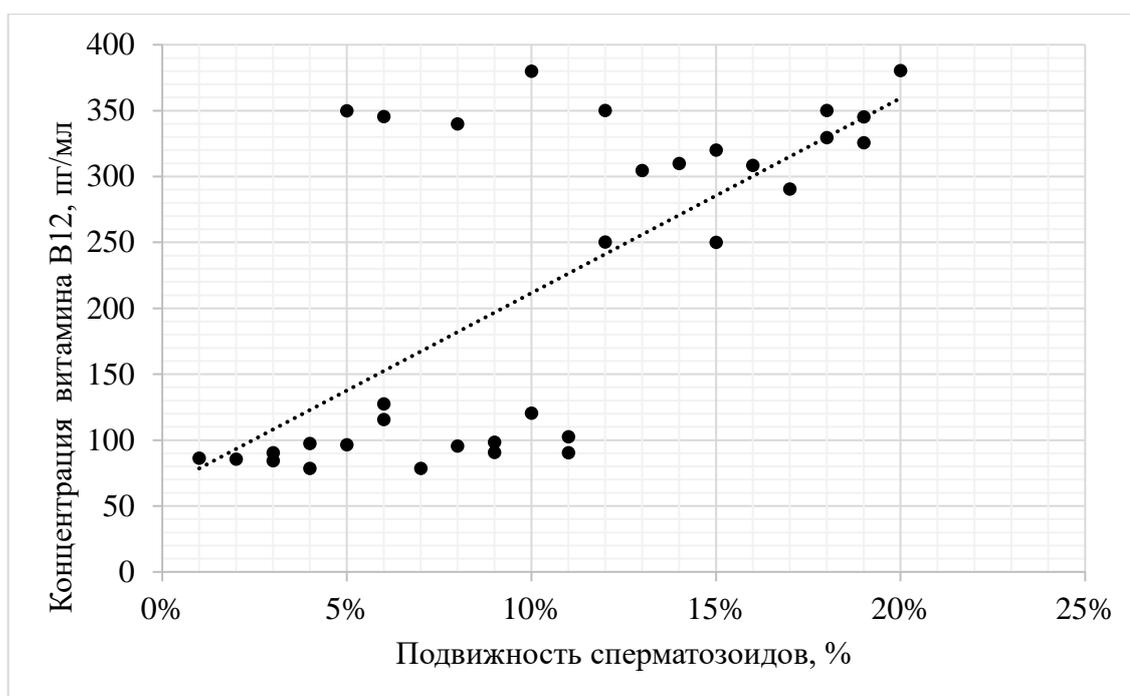


Рисунок 19 – Зависимость подвижности сперматозоидов в спермоплазме у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией от концентрации витамина В₁₂

Вероятно, снижение концентрации витамина В₁₂ связано с его участием в фолат-зависимом реметелировании гомоцистеина. В научной литературе имеются данные о лечении бесплодных мужчин витамином В₁₂ с целью повышения фертильности. В 2000 году Sinclair предложил использовать препараты витамина В₁₂ для увеличения количества и подвижности сперматозоидов [214]. В 2013 году была предложена пероральная терапия препаратами витамина В₁₂, которая приводит к улучшению жизнеспособности сперматозоидов, их подвижности и целостности ДНК, и как итог может повысить вероятность успешного оплодотворения [118].

Витамин В₁₂ также участвует в синтезе ДНК, в делении клеток, таким образом, витамин В₁₂ необходим для процессов, требующих высокой скорости обновления клеток, таких как клетки крови, слизистых оболочек, эпидермиса [80]. В том числе, можно предположить, что цианкобаламин активирует деление клеток, выстилающих семенные канатики, в результате этого происходит улучшение качества спермы.

При сравнении групп пациентов между собой не было выявлено статистически значимых отличий между ними.

3.5. Определение концентрации гомоцистеина у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли с сопутствующей астенозооспермией

При определении концентрации гомоцистеина у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией (группа 2) было выявлено повышение концентрации гомоцистеина в спермоплазме, которое составило 291,4 нг/мл ($p=0,003$), что в 1,5 раза выше по сравнению с контрольной группой (Рисунок 20).

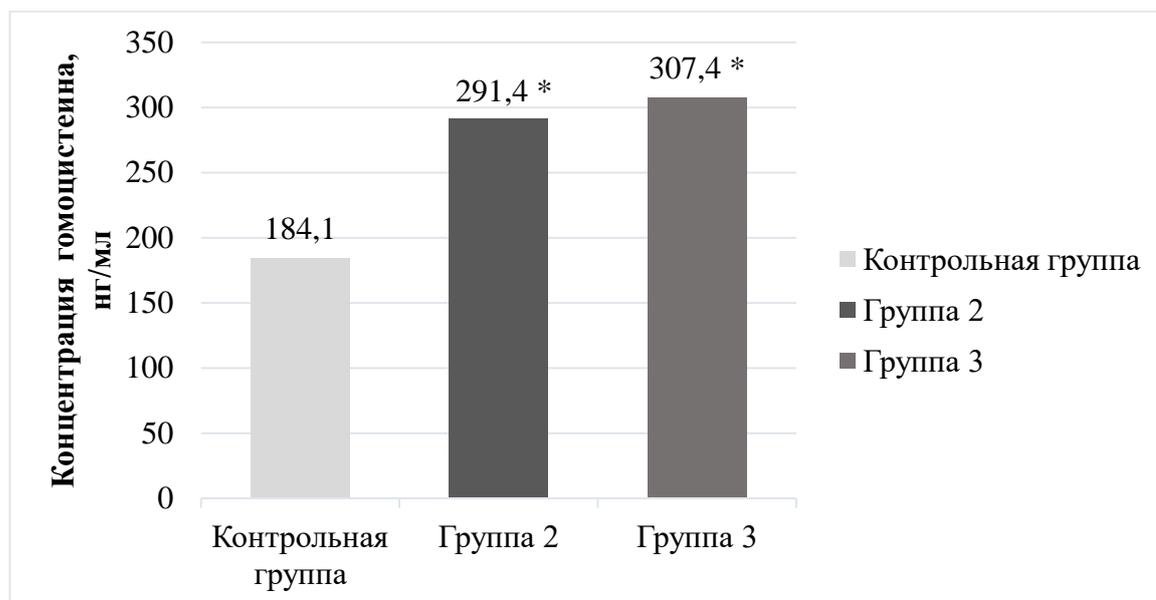


Рисунок 20 – Концентрация гомоцистеина в спермоплазме у пациентов, нг/мл

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

При проведении корреляционного анализа в контрольной группе пациентов была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь средней силы между подвижностью сперматозоидов и концентрацией гомоцистеина в спермоплазме $r = -0,54$ ($p = 0,004$) (Рисунок 21).

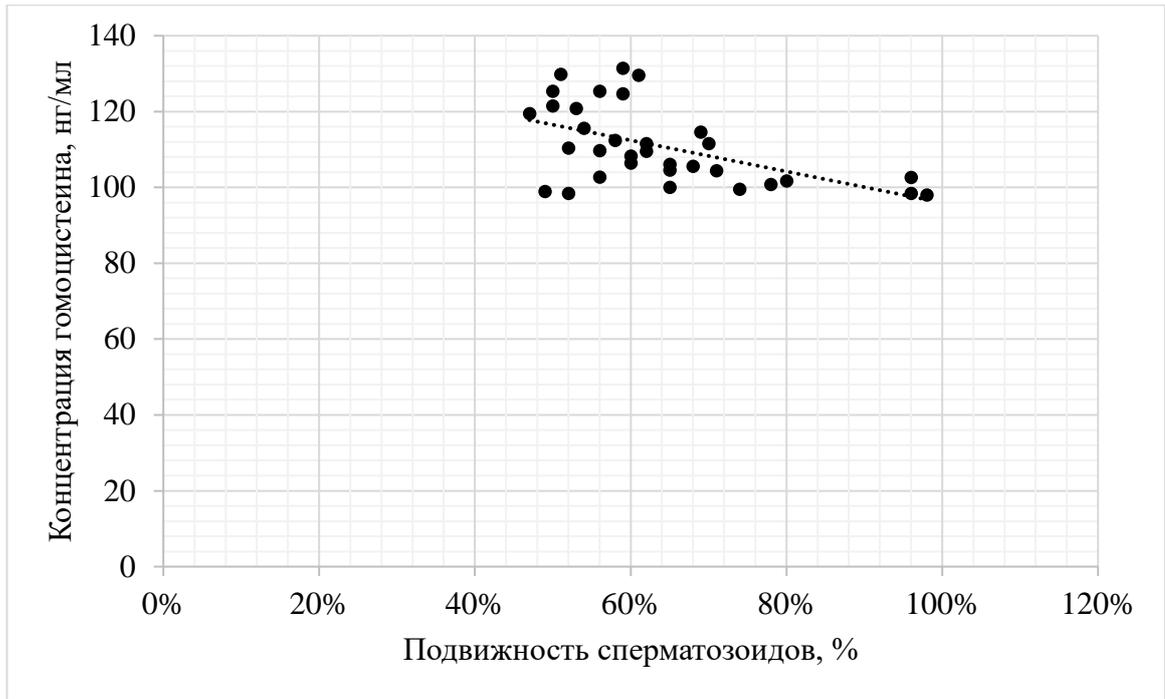


Рисунок 21 – Зависимость подвижности сперматозоидов в спермоплазме от концентрации гомоцистеина у обследуемых контрольной группы

Также была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь средней силы между концентрацией витамина В₁₂ и концентрацией гомоцистеина в спермоплазме у обследуемых контрольной группы $r=-0,47$ ($p < 0,05$) (Рисунок 22).

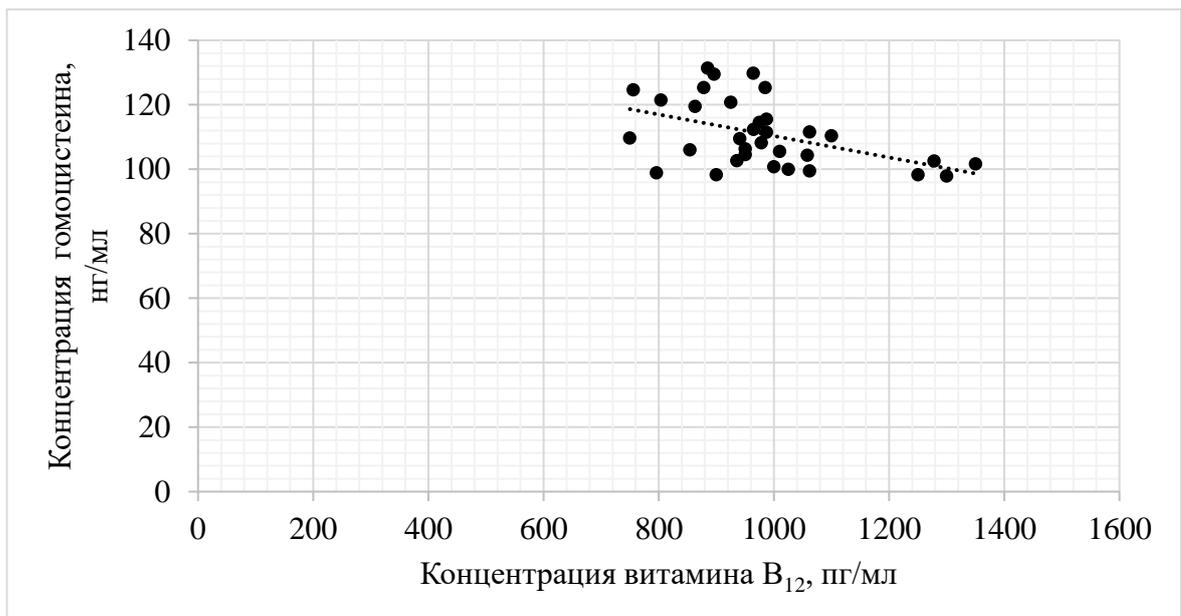


Рисунок 22 – Зависимость концентрации гомоцистеина от концентрации витамина В₁₂ у пациентов контрольной группы

При проведении корреляционного анализа была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь высокой силы между концентрацией витамина В₁₂ и концентрацией гомоцистеина в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией $r=-0,72$ ($p= 0,001$) (Рисунок 23).

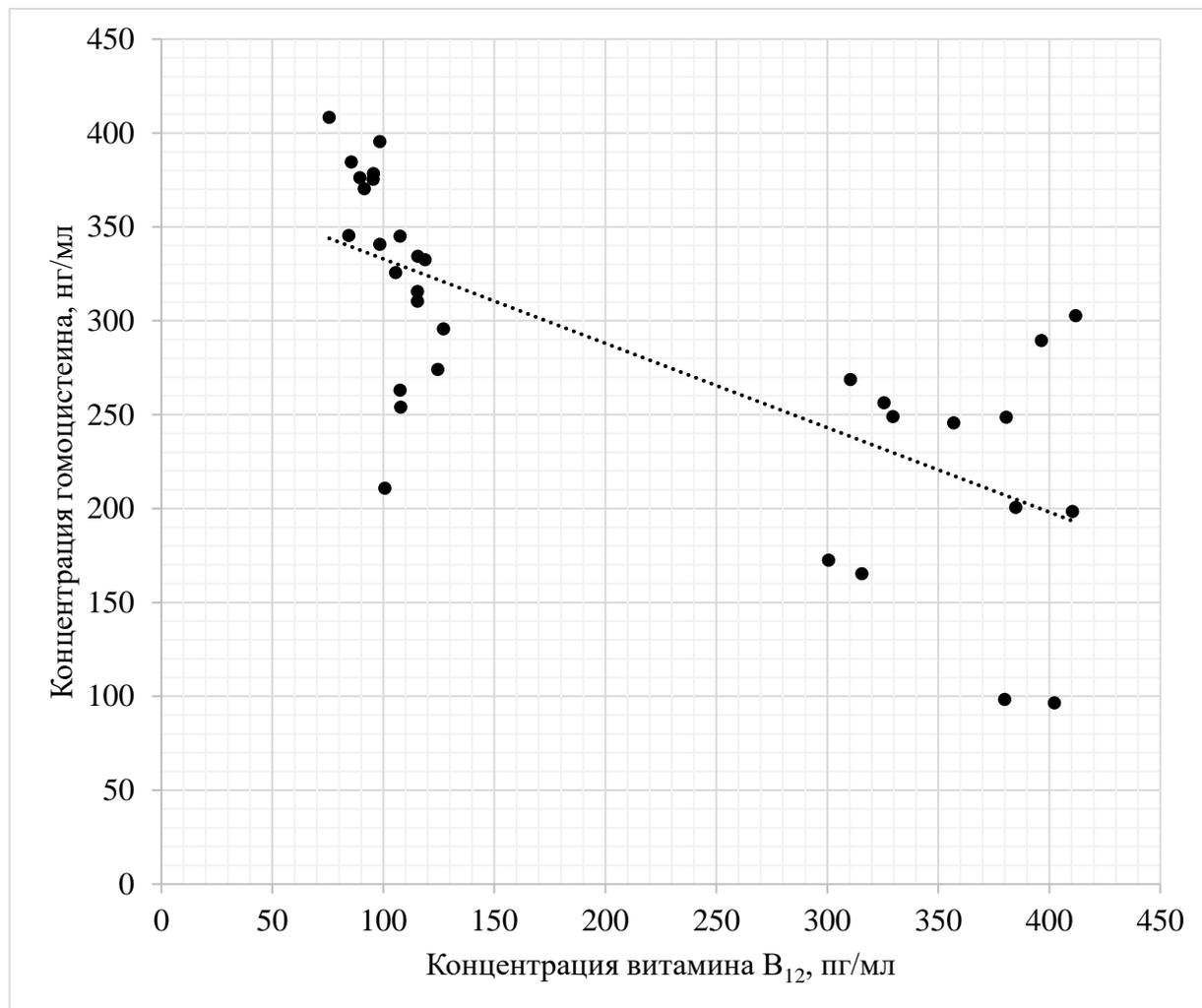


Рисунок 23 – Зависимость концентрации гомоцистеина от количества витамина В₁₂ у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией

Также была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь средней силы между подвижностью сперматозоидов и концентрацией гомоцистеина в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией $r=-0,45$ ($p < 0,05$), т.е. при увеличении концентрации гомоцистеина в спермоплазме подвижность сперматозоидов снижается (Рисунок 24).

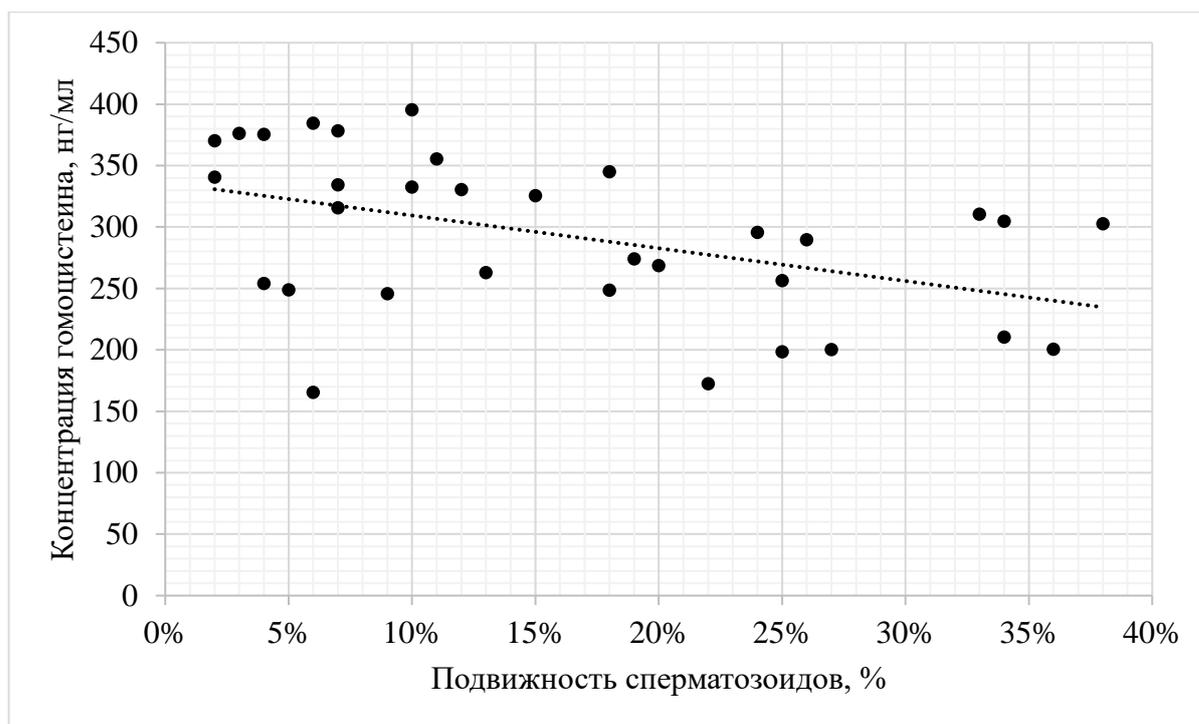


Рисунок 24 – Зависимость подвижности сперматозоидов от концентрации гомоцистеина у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией

3.6. Определение концентрации гомоцистеина у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией

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

При проведении корреляционного анализа у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь высокой силой между концентрацией витамина В₁₂ и гомоцистеином в спермоплазме $r=-0,76$ ($p=0,001$) (Рисунок 25).

Также в этой группе была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь высокой силы между концентрацией гомоцистеина и подвижностью сперматозоидов $r=-0,73$ ($p=0,001$) (Рисунок 26).

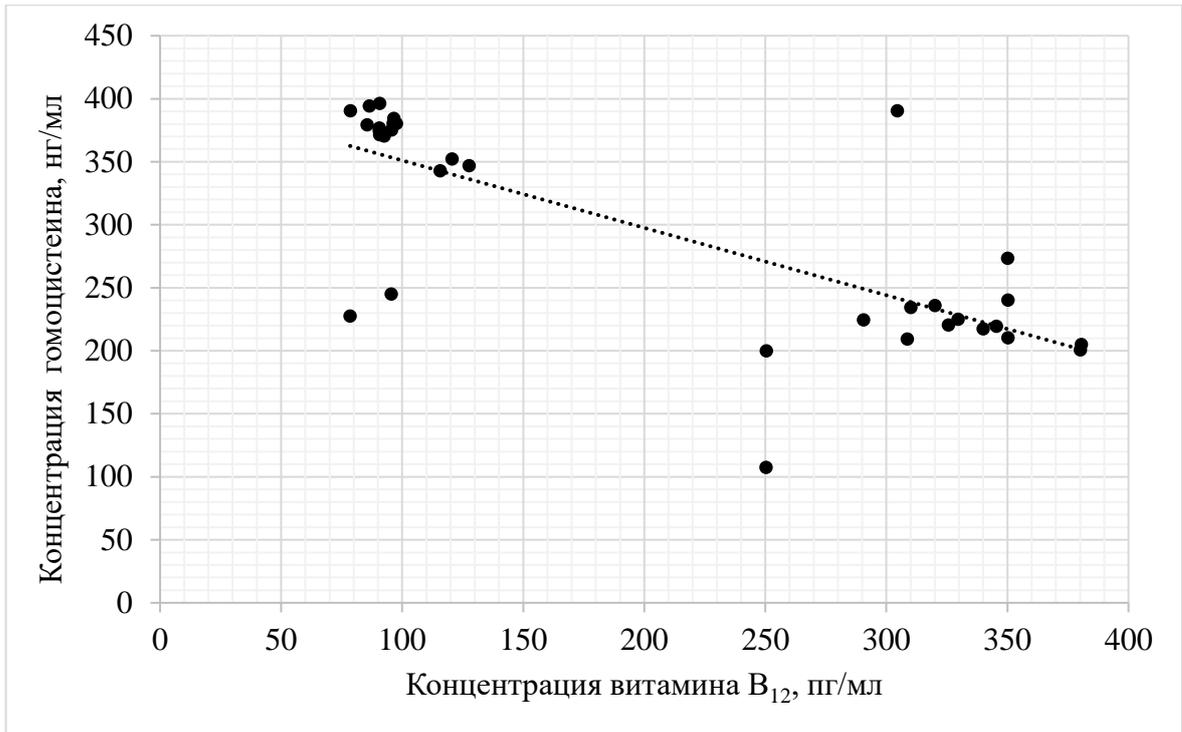


Рисунок 25 – Зависимость концентрации гомоцистеина от концентрации витамина В₁₂ у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией

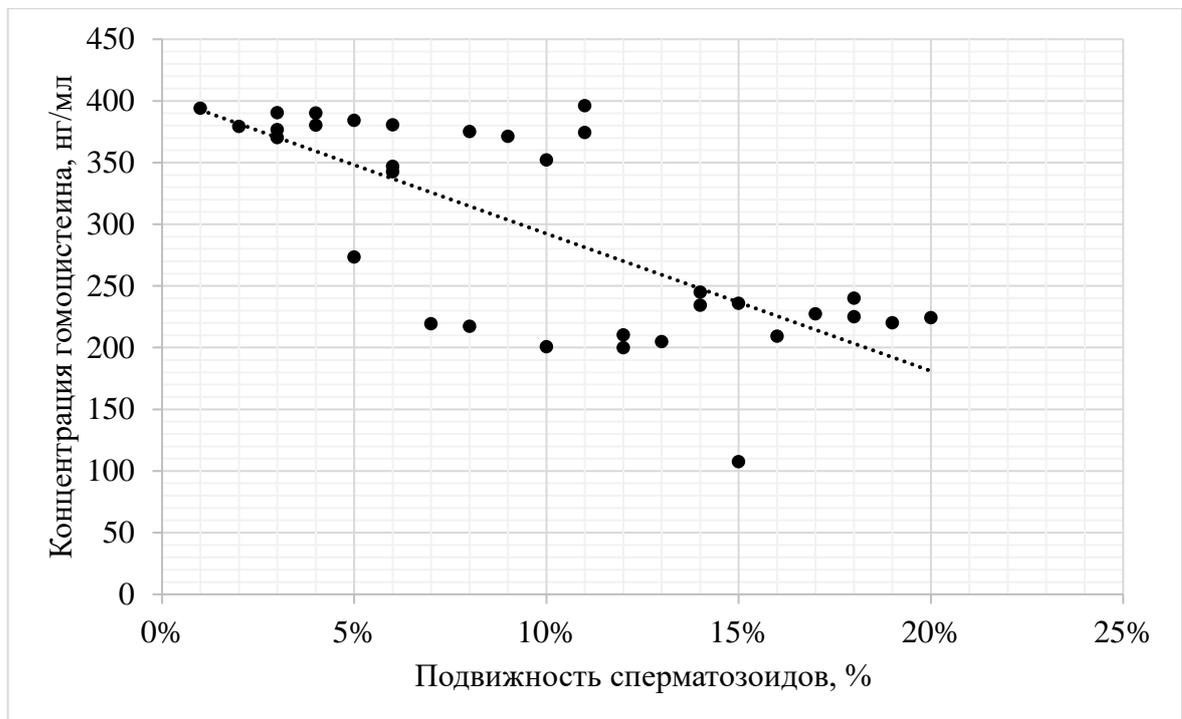


Рисунок 26 – Зависимость подвижности сперматозоидов в спермоплазме от концентрации гомоцистеина у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией

При проведении корреляционного анализа в исследуемых группах наблюдалась одинаковая тенденция. При снижении концентрации витамина В₁₂ повышается уровень гомоцистеина, а подвижность сперматозоидов снижается.

Мы предполагаем, что повышение уровня гомоцистеина в спермоплазме может быть связано со снижением концентрации витамина В₁₂.

В результате проводимых исследований, по литературным данным, было обнаружено, что гипергомоцистеинемия в организме человека ингибирует образование фермента эндотелиальной синтазы оксида азота (NO-синтаза III КФ 1.14.13.39), что приводит к снижению количества оксида азота [140]. Оксид азота является модулятором многих физиологических процессов, в том числе сперматогенеза за счет активации цитозольной формы гуанилатциклазы, последующего синтеза цГМФ и активации цГМФ-зависимых протеинкиназ [167]. Известно, что в сперматозоидах человека содержится фермент эндотелиальная синтаза оксида азота, которая синтезирует метастабильный свободный радикал оксида азота. Этот радикал также играет важную роль в обеспечении подвижности сперматозоидов [167]. Поэтому можно предположить, что повышение уровня гомоцистеина вызывает астенозооспермию за счет истощения уровня оксида азота.

При сравнении групп пациентов между собой не было выявлено статистически значимых отличий между ними.

3.7. Определение уровня окислительной модификации белков в спермоплазме у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией

С целью оценки выраженности окислительного стресса мы определяли ОМБ в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией. Было отмечено нарастание альдегиддинитрофенилгидразонов (АДНФГ), которые являются ранним маркером окислительной деструкции белка,

по сравнению с группой контроля. Также отмечено увеличение и поздних производных окислительной деструкции белка кетондинитрофенилгидразонов (КДНФГ) спонтанной ОМБ. По этим данным можно оценить степень выраженности окислительного стресса, длительность, интенсивность повреждения [77,79]. Результаты исследования представлены в таблице 5.

Таким образом, мы обнаружили выраженное статистически значимое нарастание содержания АДНФГ и КДНФГ в спермоплазме пациентов с изучаемыми патологиями на трех максимумах поглощения при спонтанной ОМБ.

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

Таблица 5 – Уровень окислительной модификации белков в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией и у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией

Длина волны	λ 356 Me [Q1- Q3]	λ 370 Me [Q1- Q3]	λ 430 Me [Q1- Q3]	λ 530 Me [Q1- Q3]	λ 356 Me [Q1- Q3]	λ 370 Me [Q1- Q3]	λ 430 Me [Q1- Q3]	λ 530 Me [Q1- Q3]	λ 356 Me [Q1- Q3]	λ 370 Me [Q1- Q3]	λ 430 Me [Q1- Q3]	λ 530 Me [Q1- Q3]
Группы	Контрольная группа				Группа 2				Группа 3			
Спонтанная ОМБ	0,23 [0,11; 0,29]	0,17 [0,09; 0,38]	0,12 [0,07; 0,15]	0,13 [0,05; 0,13]	0,39* [0,26; 0,63]	0,38 [0,27; 0,55]	0,20* [0,18; 0,24]	0,23* [0,20; 0,27]	0,45* [0,44; 0,55]	0,40 [0,40; 0,45]	0,45* [0,42; 0,48]	0,45* [0,41; 0,49]
Индукциро- ванная в реакции Фентона ОМБ	0,42 [0,14; 0,64]	0,35 [0,11; 0,46]	0,20 [0,12; 0,29]	0,14 [0,11; 0,27]	0,93 [0,30; 0,94]	0,71 [0,30; 0,99]	0,35 [0,23; 0,70]	0,34 [0,30; 0,68]	0,55 [0,50; 0,65]	0,48 [0,45; 0,68]	0,46 [0,32; 0,70]	0,52 [0,44; 0,89]

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

Исходя из наших результатов можно предположить, что у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией (группа 2) отмечается высокая доля нарастания КДФГ, что указывает на активный переход первичных маркеров во вторичные. Снижается антиоксидантная защита организма, и он не может противостоять реакциям свободно-радикального окисления. Причинами этого могут быть ишемия, которая приведет к увеличению свободных радикалов, а также, возможно, присоединение воспалительного процесса. При воспалении может отмечаться активация лейкоцитов, вследствие чего они могут продуцировать активные формы кислорода. Еще одной причиной снижения антиоксидантной защиты, является снижение концентрации цинка в спермоплазме. Он участвует в реакциях антиоксидантной защиты в качестве кофактора фермента супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1), и его снижение предположительно может привести к развитию окислительного стресса.

Для пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией (группа 3) при определении спонтанного окисления также наблюдается повышение карбонильных производных в спермоплазме. Это может быть связано с несколькими причинами:

- 1) локальный тепловой стресс;
- 2) гипоксия.

Тепловой стресс может приводить к денатурации белков спермоплазмы. Нарушаются функции белков теплового шока, которые отвечают за транспорт, транскрипцию, передачу сигнала [201].

3.7.1. Оценка резервно-адаптационного потенциала спермоплазмы

Для оценки устойчивости спермоплазмы к окислительному воздействию провели анализ резервно-адаптационного потенциала (РАП). При этом за 100 % принимали уровень индуцированной ОМБ и оценивали долю спонтанной в ней.

По уровню РАП можно судить о накоплении у пациентов дополнительных альдегидных и кетонных производных при добавлении в реакционную среду окислительной смеси [79].

При определении спонтанной ОМБ в металл-катализируемой у пациентов группы 2 и группы 3 в спермоплазме наблюдалось снижение РАП. Данные результаты можно расценить как истощение резервных возможностей организма, а соответственно при этом может наблюдаться окислительный стресс (Таблица 6).

Таблица 6 – Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы

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

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

Как видно из таблицы 6, можно судить об истощении резервных способностей организма по отношению к окислительному стрессу у пациентов 2 и 3 группы по сравнению с контрольной группой обследуемых. На рисунках 27-38 представлены данные резервно - адаптационного потенциала спермоплазмы.

На длине волны 356 нм (рисунки 27-29) мы отметили снижение РАП спермоплазмы у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией, такая же тенденция отмечалась и у пациентов с варикоцеле II-III степени с сопутствующей астенозооспермией по сравнению с контрольной группой обследуемых.



Рисунок 27 – Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы на длине волны 356 нм у пациентов контрольной группы



Рисунок 28 – Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы на длине волны 356 нм у пациентов 2 группы



Рисунок 29 – Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы на длине волны 356 нм у пациентов 3 группы

Снижение РАП спермоплазмы наблюдается и на длине волны 370 нм (рисунки 30-32) у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией по сравнению с контрольной группой обследуемых. У пациентов с варикоцеле II-III степени с сопутствующей астенозооспермией на данной длине волны отмечается статистически значимое снижение РАП спермоплазмы по сравнению с контрольной группой обследуемых.



Рисунок 30 – Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы на длине волны 370 нм у пациентов контрольной группы



Рисунок 31 – Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы на длине волны 370 нм у пациентов 2 группы



Рисунок 32 – Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы на длине волны 370 нм у пациентов 3 группы

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

На длине волны 430 нм (рисунки 33-35) мы наблюдали снижение РАП спермоплазмы у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией и у пациентов с варикоцеле II-III степени с сопутствующей астенозооспермией, что является статистически значимым для пациентов с варикоцеле II-III степени с сопутствующей астенозооспермией по сравнению с контрольной группой обследуемых.



Рисунок 33 – Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы на длине волны 430 нм у пациентов контрольной группы



Рисунок 34 – Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы на длине волны 430 нм у пациентов 2 группы



Рисунок 35 – Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы на длине волны 430 нм у пациентов 3 группы

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

Тенденция снижения РАП спермоплазмы прослеживается и на длине волны 530 нм (рисунки 36-38) и является статистически значимой для пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией, и для пациентов с варикоцеле II-III степени с сопутствующей астенозооспермией по сравнению с контрольной группой обследуемых.



Рисунок 36 – Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы на длине волны 530 нм у пациентов контрольной группы



Рисунок 37 – Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы на длине волне 530 нм у пациентов 2 группы

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



Рисунок 38 – Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы на длине волны 530 нм у пациентов 3 группы

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

Мнение авторов по поводу трактовки уровня РАП в научных публикациях расходится. Одни считают, что если доля спонтанного окисления ниже, то РАП будет выше [31]. Другие считают иначе, что низкая доля спонтанного окисления в металл-катализируемой ОМБ, наоборот, отражает уменьшение резервно-адаптационного потенциала. При его уменьшении возможно снижение защиты организма от свободных радикалов [38]. Мы придерживаемся первого мнения и считаем, что РАП выше при меньшей доле спонтанного окисления. Таким образом, мы отметили снижение РАП у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией и у пациентов с варикоцеле II-III степени с сопутствующей астенозооспермией на всех длинах волн, но у пациентов с варикоцеле II-III степени с сопутствующей астенозооспермией снижение оказалось более выражено, что может быть связано с более глубоким развитием окислительного стресса в этой группе пациентов.

3.7.2. Определение концентрации конечных метаболитов оксида азота в спермоплазме у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией

В развитии окислительного стресса важную роль играет оксид азота, который с одной стороны может выступать как прооксидант, а с другой стороны может обладать антиоксидантным действием [78].

При исследовании конечных метаболитов оксида азота в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией мы наблюдали незначительное увеличение метаболитов NO в 1,4 раза, что не явилось статистически значимым по сравнению с контрольной группой. У пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией было выявлено увеличение метаболитов оксида азота в 2,5 раза, что явилось статистически значимым по сравнению с контрольной группой (Рисунок 39).

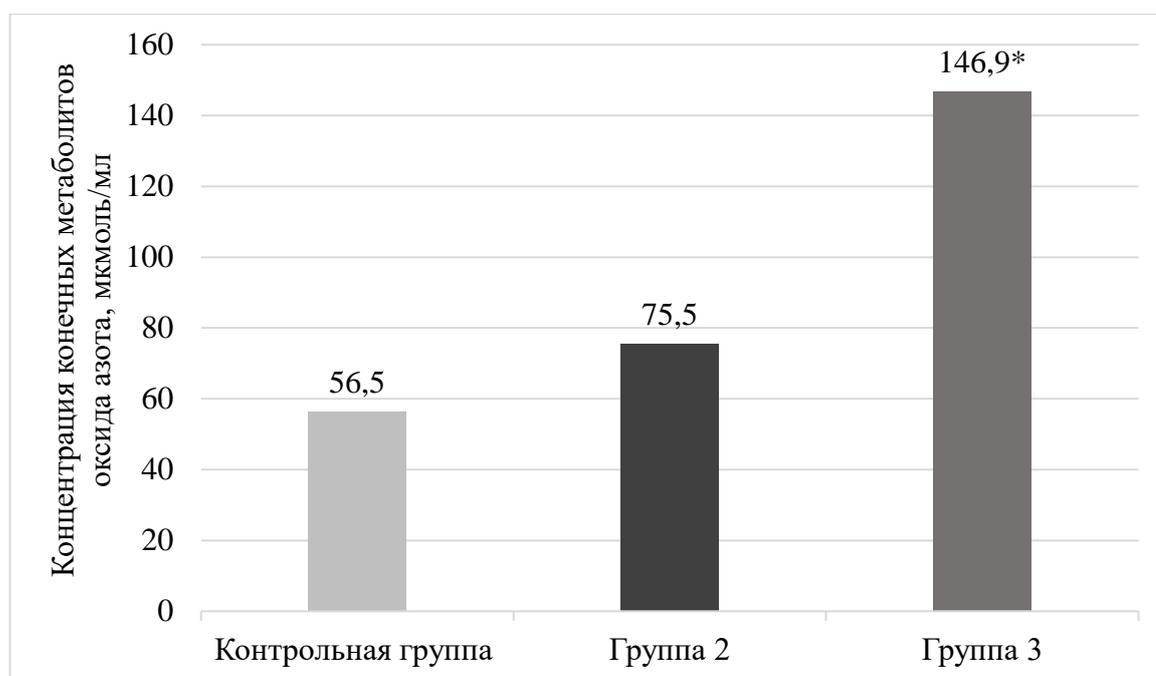


Рисунок 39 – Изменение концентрации конечных метаболитов оксида азота в спермоплазме у пациентов, мкмоль/мл

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

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

У обследуемых контрольной группы и у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией не было выявлено достоверной корреляционной связи.

Оксид азота в физиологических условиях является мощным антиоксидантом и важным регулятором различных процессов. Также NO может выступать в качестве фактора апоптоза при развитии окислительного стресса [63,78].

Увеличение концентрации конечных стабильных метаболитов NO (NO_2/NO_3) в спермоплазме у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией может быть связано и с гипоксией яичек, которая приводит к

усилению синтеза цитокинов, стимулирующих экспрессию индуцибельной NOS, что может приводить к повышению синтеза оксида азота [45].

При взаимодействии оксида азота с супероксид-ионом образуется пероксинитрит, который является сильным окислителем. Он окисляет SH группу ферментов НАДН-убихинон-оксидоредуктазы (КФ 7.1.1.2), сукцинат-убихинон-оксидоредуктазы (КФ 1.3.5.1) [170], участвующих в энергетическом обмене, что может приводить к снижению выработки АТФ и к снижению подвижности сперматозоидов.

При сравнении групп пациентов между собой не было выявлено статистически значимых отличий между ними.

3.8. Определение активности катепсинов В, L и Н в спермоплазме у пациентов с хроническим простатитом III В/синдромом хронической тазовой боли и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией

С целью оценки состояния лизосомального цистеинового протеолиза мы определяли активность цистеиновых катепсинов В, L и Н в спермоплазме. Было выявлено статистически значимое снижение их активности у пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени, с сопутствующей астенозооспермией по сравнению с контрольной группой (Рисунок 40-42, Таблица 7).

Таблица 7 – Изменение активности катепсинов в спермоплазме, нмоль/ч×л

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

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

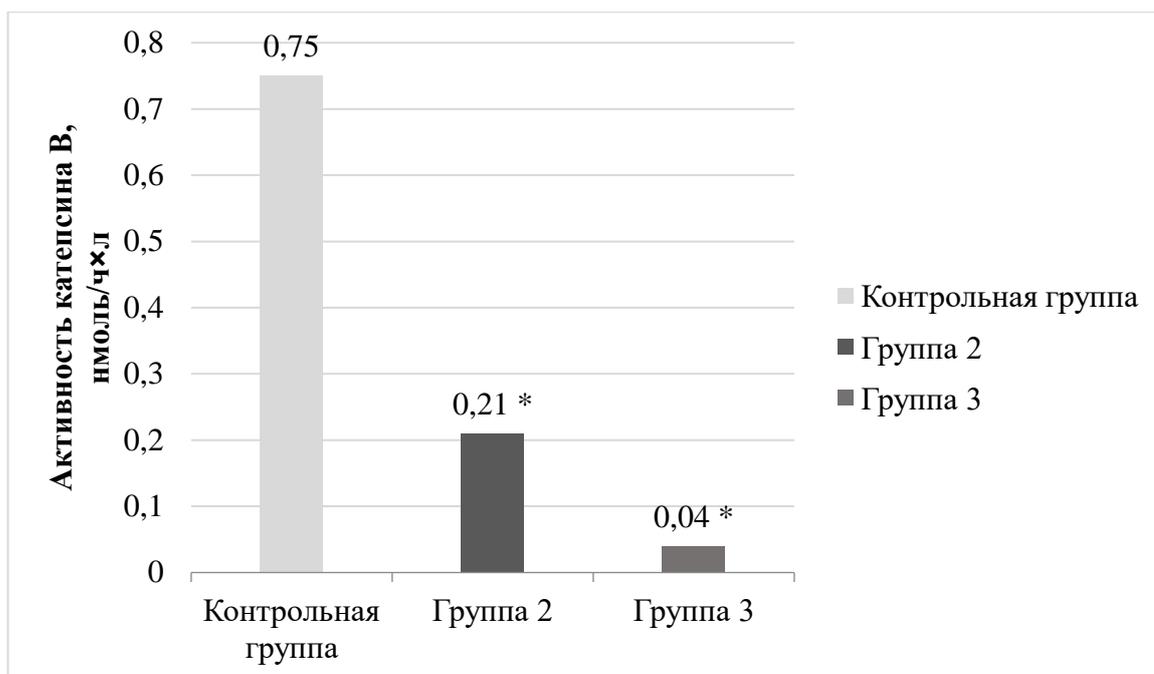


Рисунок 40 – Активность катепсина В в спермоплазме у пациентов, нмоль/чхл

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

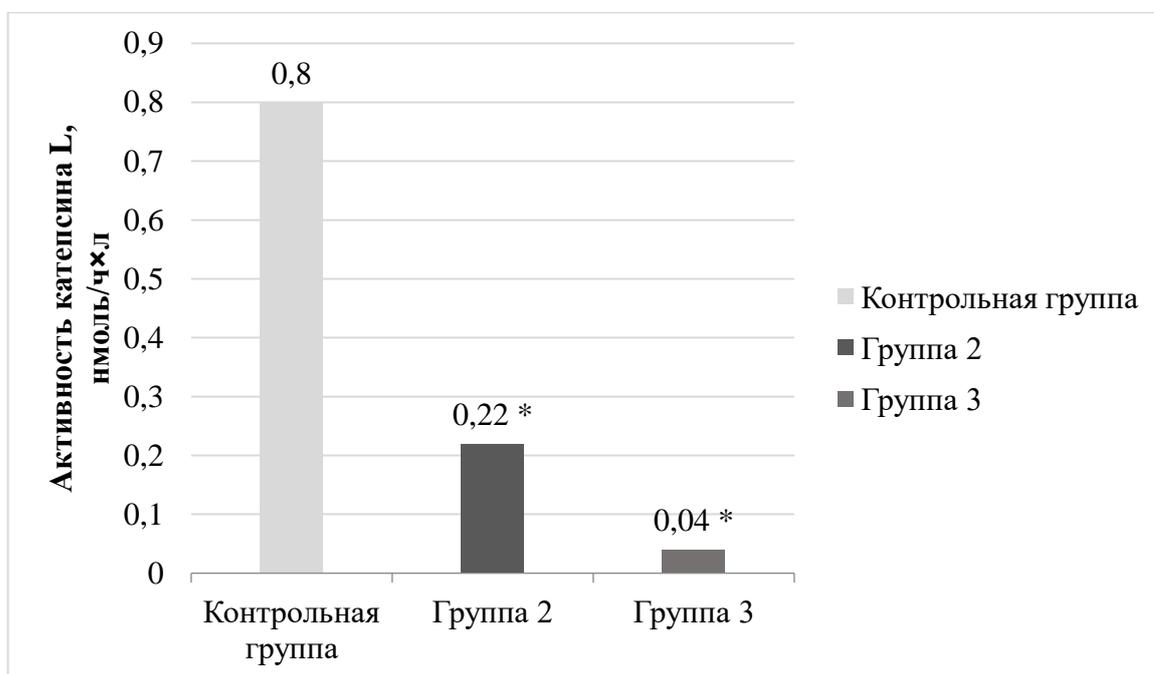


Рисунок 41 – Активность катепсина L в спермоплазме у пациентов, нмоль/чхл

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

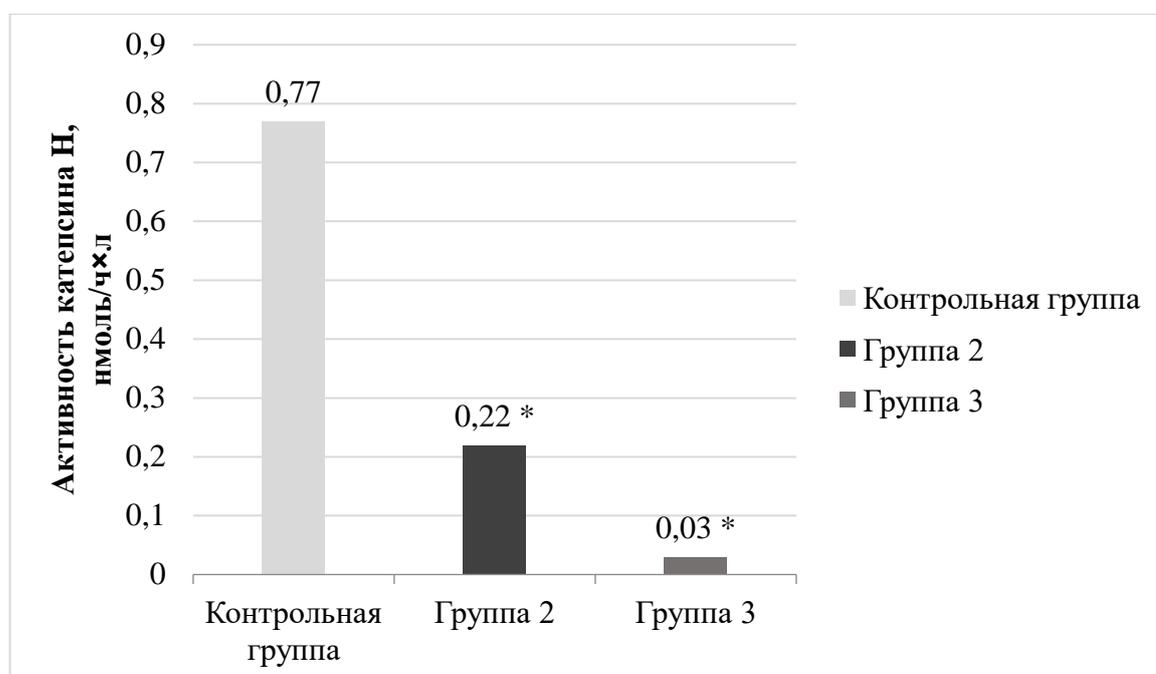


Рисунок 42 – Активность катепсина Н в спермоплазме у пациентов, нмоль/ч×л

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

В таблице 8 представлены корреляционные взаимосвязи между подвижностью сперматозоидов и активностью катепсинов В, L и Н в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией.

Таблица 8 – Корреляционные взаимосвязи между подвижностью сперматозоидов и активностью катепсинов В, L и Н в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией

	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
Подвижность сперматозоидов	$r=0,54$ ($p < 0,05$)	$r=0,55$ ($p < 0,05$)	$r= 0,49$ ($p < 0,05$)

Наиболее выраженной оказалась корреляция средней силы между подвижностью сперматозоидов и активностью катепсина L $r=0,55$ ($p < 0,05$) у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией (Рисунок 43).

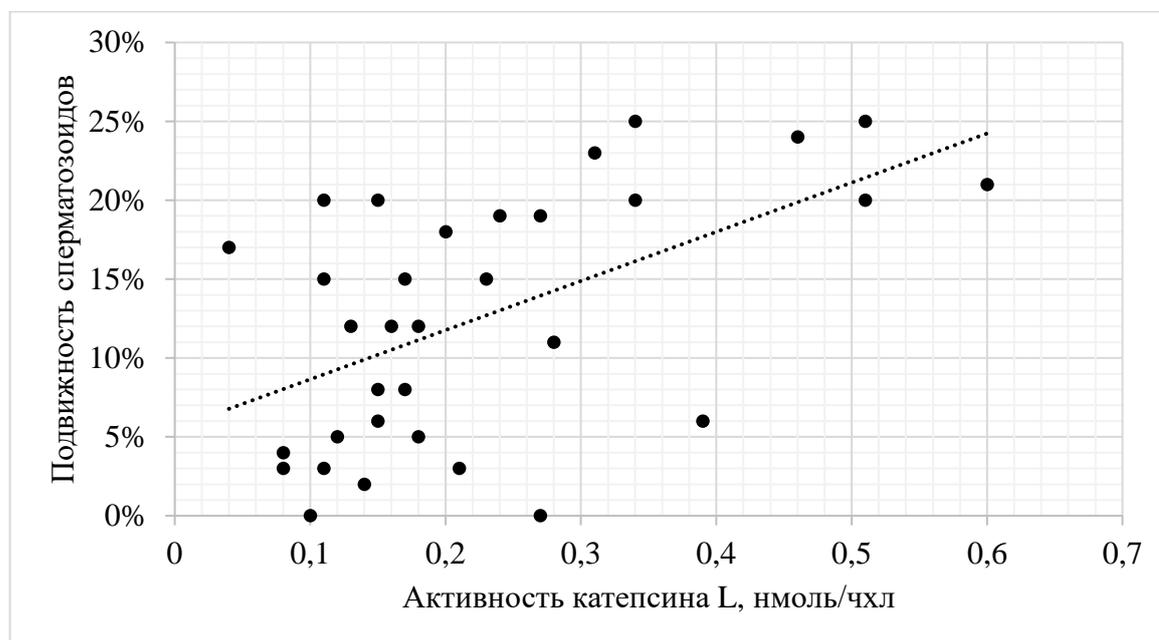


Рисунок 43 – Зависимость подвижности сперматозоидов от активности катепсина L у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией

В таблице 9 представлены корреляционные взаимосвязи между подвижностью сперматозоидов и активностью катепсинов В, L и Н в спермоплазме пациентов с варикоцеле II и III с сопутствующей астенозооспермией.

Таблица 9 – Корреляционные взаимосвязи между подвижностью сперматозоидов и активностью катепсинов В, L и Н в спермоплазме пациентов с варикоцеле II и III с сопутствующей астенозооспермией

	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н
Подвижность сперматозоидов	$r=0,38$ ($p < 0,05$)	$r=0,30$ ($p < 0,05$)	$r= 0,42$ ($p < 0,05$)

Наиболее выраженной оказалась корреляция средней силы выраженности между подвижностью сперматозоидов и активностью катепсина Н $r=0,42$ ($p < 0,05$) у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией

Снижение активности лизосомальных цистеиновых протеаз (катепсинов В, L и Н) в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией может быть связана с несколькими причинами:

- с изменением рН среды, что приведет к инактивации работы данных катепсинов из-за нарушения аутокаталитического процессинга. Оптимум действия рН для катепсина В находится в пределах 5,5-6,0, для катепсина L в пределах 5,0, а для катепсина Н в пределах 6,5-6,8.

- другая причина заключается в нарушении акросомальной реакции. Она необходима для транспортировки содержимого акросомы к месту локального разрушения оболочки яйцеклетки. По литературным данным активность акрозина, который содержится в акросоме сперматозоида снижается у пациентов с бесплодием по сравнению с фертильными мужчинами [133]. Акрозин способствует связыванию сперматозоидов с *zona pellucida*. Исходя из выше перечисленного можно предположить, что катепсины В, L, Н, содержащиеся в акросоме, могут принимать участие в оплодотворении яйцеклетки, а снижение их активности, возможно, приведет к нарушению процесса оплодотворения.

Снижение активности катепсинов В, L, Н в спермоплазме у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией может быть связано с повышением температуры в яичках, в результате переполнения последних венозной кровью. Тепловой стресс может способствовать образованию активных форм кислорода, что приведет к развитию окислительного стресса [135]. В результате окисления цистеиновых групп образуются дисульфидные связи и фермент теряет свою активность.

При варикоцеле наблюдается снижение активности сперматогенного эпителия [61], в результате чего происходит нарушение выработки сперматозоидов, а именно снижается их нормальное количество.

В современной литературе существуют данные, что активность катепсина В ингибируется NO через S-нитрозилирование остатков цистеина в активном центре фермента [155]. Возможно, и снижение активности катепсинов L и H, полученное в нашем исследовании, также происходит под действием NO.

При сравнении групп пациентов между собой не было выявлено статистически значимых отличий между ними.

3.9. Заключение по разделу

Окислительный стресс является одним из факторов, приводящих к развитию в организме человека различных патологических процессов, в том числе он, предположительно, может вызывать снижение жизнеспособности сперматозоидов. Взаимосвязь развития ОС при изучаемых патологиях можно представить в виде следующей схемы (Рисунок 44).

В проведенных нами исследованиях была выявлена зависимость между высоким уровнем гомоцистеина, ОМБ в спермоплазме и снижением подвижности сперматозоидов.

Мы предполагаем, что снижение количества витамина В₁₂ в спермоплазме приводит к повышению уровня гомоцистеина в спермоплазме, который, в свою очередь, ведет к развитию окислительного стресса. ОС ассоциирован с повышением уровня ОМБ в спермоплазме, что является его ранним маркером. Активность катепсинов в спермоплазме снижается вследствие окислительной модификации активного центра ферментов. В своем строении катепсины имеют SH группы, которые могут окисляться и образовывать дисульфидные связи, что ведет к их инактивации.

У пациентов с варикоцеле II-III степени с сопутствующей астенозооспермией наблюдалось увеличение уровня конечных метаболитов оксида азота, что может быть связано с гипоксией яичка, которая приводит к усилению синтеза цитокинов, стимулирующих экспрессию индуцибельной NOS синтазы.

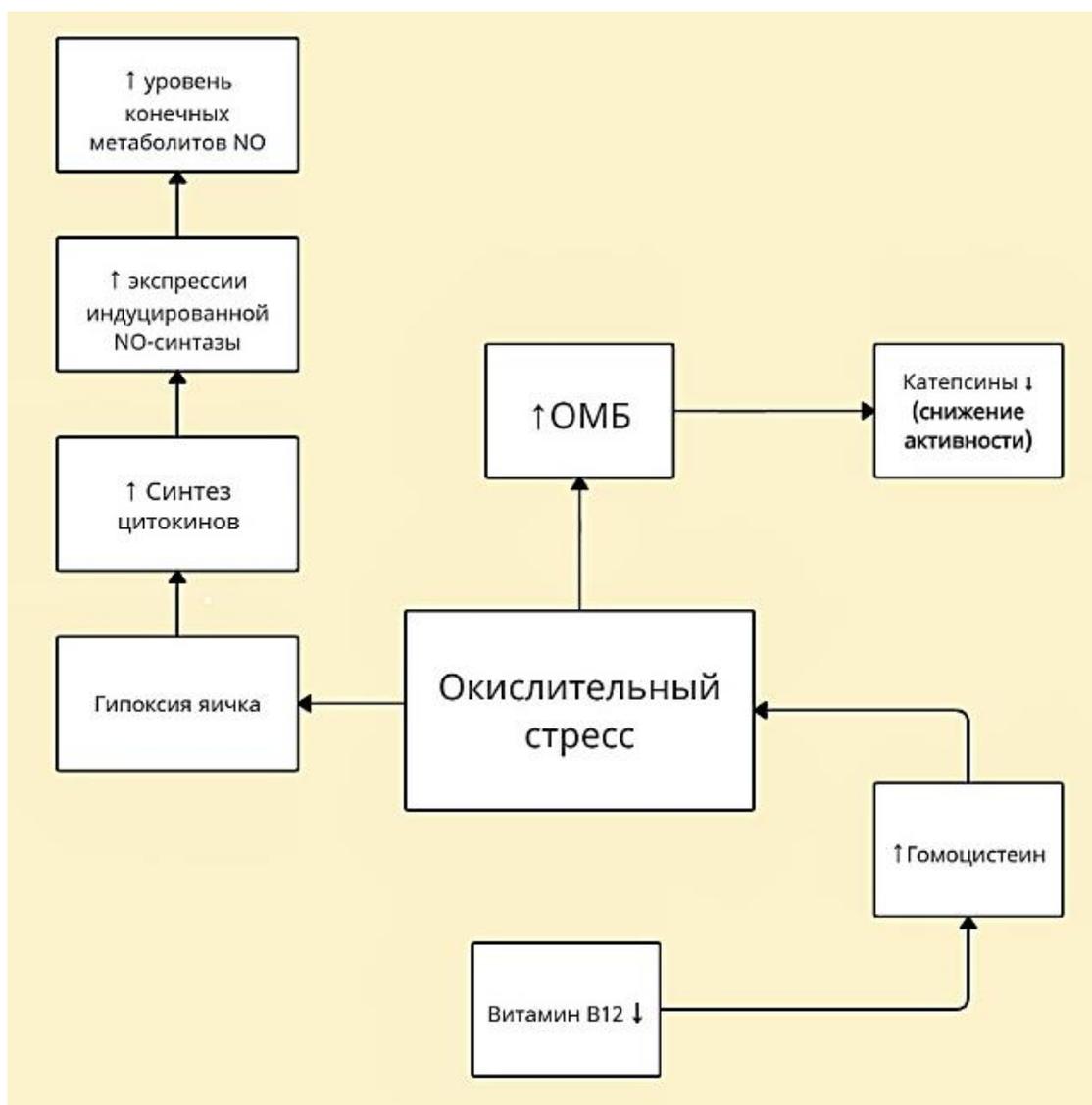


Рисунок 44 – Взаимосвязь развития ОС при ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией и при варикоцеле II-III степени с сопутствующей астенозооспермией

При проведении многофакторного регрессионного анализа установлено статистически значимое влияние двух факторов: концентрации витамина B_{12} и активности катепсина L на подвижность сперматозоидов у пациентов с варикоцеле. Получена регрессионная модель (R^2 скор.=0,614), описывающая снижение подвижности сперматозоидов в зависимости от изменения установленных факторов, в соответствии с уравнением:

$$y = 0,0003 X_1 + 0,7868 X_4 + 0,1337, \quad (1)$$

где y – подвижность сперматозоидов в %,

x_1 концентрация витамина B_{12} в пг/мл,

x_4 активность катепсина L в нмоль/ч×л.

Выявлен ведущий фактор - концентрация витамина B_{12} в спермоплазме, то есть, наиболее сильное влияние на снижение подвижности сперматозоидов оказывает концентрация витамина B_{12} (ρ Спирмена между подвижностью сперматозоидов и активностью катепсина $L=-0,113$; ρ Спирмена между подвижностью сперматозоидов и концентрацией витамина B_{12} $0,614$).

Для пациентов с ХП/СХТБ регрессионная модель, приемлемая для описания изменения исследуемых показателей, не найдена (R^2 скор.= $0,417$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день мужской фактор бесплодия является важной проблемой, так как имеется тенденция к его росту. В связи с этим исследование патологии мужской репродуктивной функции является актуальной задачей.

В большинстве случаев обследование мужчин не требует инвазивных вмешательств, выполняется в более короткие сроки.

Причины, приводящие к снижению качества спермы, до конца не изучены. Факторами риска, приводящими к снижению мужской фертильности, являются: образ жизни, вредные привычки, питание, стресс, неблагоприятная экологическая обстановка.

В связи с этим, раннее выявление заболеваний мужской репродуктивной системы является актуальной медицинской проблемой и требует внедрения новых диагностических надежных и информативных тестов.

Целью нашего исследования стал поиск новых биохимических маркеров мужского бесплодия, а именно взаимосвязь количества витамина В₁₂, уровня гомоцистеина, активность катепсинов В, L, Н, как показателей цистеинового протеолиза, ОМБ, конечных метаболитов оксида азота, как показателей окислительного стресса, с подвижностью сперматозоидов в спермоплазме у пациентов с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией и у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией.

В ходе исследования были сформированы три группы пациентов, проходивших обследование в клинко-диагностической лаборатории на базе ГБУ РО «ГКБ» № 8 г. Рязани. В контрольную (первую) группу вошли пациенты без нарушения фертильности, проходившие обследование перед ЭКО, которые были сопоставимы по возрасту, полу с пациентами второй и третьей групп. Во вторую группу вошли пациенты с ХП/СХТБ с сопутствующей астенозооспермией. Третью группу составили пациенты с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие для участия в исследовании.

В качестве материала для исследования использовалась спермоплазма.

В ходе исследования было выявлено, что у пациентов обеих групп в спермоплазме снижено количество витамина В₁₂ и повышена концентрация гомоцистеина.

Была выявлена положительная корреляционная взаимосвязь средней степени выраженности между подвижностью сперматозоидов и количеством витамина В₁₂ в спермоплазме у пациентов обеих групп. Также была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь высокой силы между количеством витамина В₁₂ и количеством гомоцистеина в спермоплазме у пациентов обеих групп в спермоплазме. Также была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь высокой силы между количеством гомоцистеина и подвижностью сперматозоидов в спермоплазме у пациентов с варикоцеле II-III степени с сопутствующей астенозооспермией.

Таким образом, определение количества витамина В₁₂ и гомоцистеина в спермоплазме у пациентов обеих групп может рассматриваться в качестве возможных маркеров в диагностике снижения мужской фертильности.

При определении уровня ОМБ у пациентов обеих групп в спермоплазме была отмечена тенденция к увеличению ОМБ по сравнению с контрольной группой пациентов, что говорит о развитии окислительного стресса. При изучении резервно-адаптационного потенциала спермоплазмы мы получили данные о его истощении у пациентов обеих групп.

При определении активности цистеиновых катепсинов В, L, Н у пациентов обеих групп в спермоплазме было отмечено снижение их активности, что тоже может рассматриваться как один из возможных маркеров нарушения мужской фертильности. При проведении корреляционного анализа между активностью катепсинов В, L, Н и подвижностью сперматозоидов в спермоплазме была выявлена положительная корреляционная взаимосвязь средней степени выраженности у пациентов обеих групп, которая оказалась статистически значимой по сравнению с пациентами контрольной группы.

ВЫВОДЫ

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

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

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

4. Уменьшение подвижности сперматозоидов ассоциируется со снижением активности катепсинов В, L, Н, снижением концентрации витамина В₁₂ и повышением гомоцистеина в спермоплазме пациентов с ХП/СХТБ и варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией по сравнению со здоровыми донорами.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 2,4-ДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразин
- cNOS – конститутивная NO –синтаза
- Cvt-путь – cytoplasmato-vacuole targeting
- eNOS – эндотелиальная NO –синтаза
- Hcy – гомоцистеин
- HRP – пероксидаза хрена
- Hsp90 – Heat shock protein 90, белок теплового шока 90
- iNOS – индуцибельная NO –синтаза
- mNOS – макрофагальная NO –синтаза
- N⁵ метил-ТГФК – производное фолиевой кислоты
- nNOS – нейрональная NO-синтаза
- TnNOS – подкласс нейрональной NO синтазы
- АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразон
- АФА – активные формы азота
- АФК – активные формы кислорода
- ГП – глутатионпероксидаза
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДНФГ – динитрофенилгидразин
- ИФА – иммуноферментный анализ
- КДНФГ – кетондинитрофенилгидразон
- МКБ-10 – международная классификация болезней 10-го пересмотра
- ОМБ – окислительная модификация белка
- ОС – окислительный стресс
- РАП – резервно-адаптационный потенциал
- ТМБ – TMB Substrate, стоп-реагент
- ТХУ – трихлоруксусная кислота

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

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абатуров, А.Е. Роль монооксида азота в неспецифической защите респираторного тракта / А.Е. Абатуров. – Текст (визуальный): непосредственный // Здоровье ребёнка. – 2009. – №1. – С. 16.
2. Байчоров, Э.Х. Варикоцеле как фактор нарушения сперматогенеза и снижения мужской фертильности / Э.Х. Байчоров, Р.И. Панченко. – Текст (визуальный): непосредственный // Астраханский медицинский журнал. – 2023. – Т. 18, №1. – С. 6-16.
3. Блашко, Э.Л. Исследование транспортных форм гомоцистеина при различных состояниях организма: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Э.Л. Блашко. – СПб., 2007. – 22 с. – Текст (визуальный): непосредственный.
4. Варикоцеле как одна из причин снижения мужской фертильности / Т.М. Сорокина, М.В. Андреева, В.Б. Черных, Л.Ф. Курило. – Текст (визуальный): непосредственный // Андрология и генитальная хирургия. – 2019. – Т.20, №3. – С. 27-35.
5. Винник, Ю.Ю. Клинико-биоимпедансометрические особенности проявлений хронического небактериального простатита с воспалительным компонентом у молодых мужчин / Ю.Ю. Винник, А.В. Кузьменко, А.А. Амельченко. – Текст (визуальный): непосредственный // Андрология и генитальная хирургия. – 2022. – Т.22, №1. – С. 38-42.
6. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы / Ю.А. Владимиров. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник Российской академии медицинских наук. – 1998. – №7. – С. 43-51.
7. Влияние аллоксана на систему глутатиона и окислительную модификацию белков в адипоцитах при экспериментальном диабете / В.В. Иванов, Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, В.В. Новицкий. – Текст (визуальный): непосредственный // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – №3. – С. 44-47.

8. Влияние экстремальных факторов на мужскую репродуктивную систему / Э.Ф. Галимова, Р.Р. Фархутдинов, Ш.М. Галимов, Т.Р. Гизатуллин. – Текст (визуальный): непосредственный // Проблемы репродукции. – 2010. – №4. – С. 60-65.

9. Галимов, Ш.Н. Репродуктивное здоровье и окружающая среда: новые подходы и технологии / Ш.Н. Галимов. – Текст (визуальный): непосредственный // Материалы 3-го Российского научного форума «Мужское здоровье и долголетие» (16 - 18 февраля 2005 г.). – М., 2005. – С. 47-48.

10. Галимова, Э.Ф. Молекулярные и клеточные механизмы функционирования мужской репродуктивной системы в условиях экстремальных и фоновых воздействий различной природы и интенсивности : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук : специальность 14.03.03 "Патологическая физиология"/ Э.Ф. Галимова. – М, 2016. – 247 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

11. Галимова, Э. L-карнитин и карбонилирование белков эякулята при бесплодии / Э. Галимова, Г. Ахмадуллина, Ш. Галимов. – Текст (визуальный): непосредственный // Врач. – 2014. – №7. – С. 40-41.

12. Глебов, А.Н. Роль кислородосвязывающих свойств крови в развитии окислительного стресса, индуцированного липополисахаридом: монография / А.Н. Глебов, Е.В. Шульга, В.В. Зинчук. – Гродно: ГрГМУ, 2011. – 216 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

13. Гомоцистеин и психическое здоровье / И.И. Мирошниченко, Ю.М. Калмыков, О.Б. Яковлева [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Психиатрия. – 2010. – №2. – С. 67-71.

14. Гомоцистеин – предиктор патологических изменений в организме человека / И.И. Мирошниченко, С.Н. Птицына, Н.Н. Кузнецова [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Российский медицинский журнал. – 2009. – Т.17, №4. – С. 224-227.

15. Гончаров, Н.П. Оксид азота (NO): физиология и метаболизм (лекция) / Н.П. Гончаров. – Текст (визуальный): непосредственный // Андрология и генитальная хирургия. – 2020. – Т.21, №3. – С. 75-79.

16. Горшунова, Н.К. Значение NO-регуляции антиагрегационной активности сосудистой стенки у больных артериальной гипертензией пожилого возраста / Н.К. Горшунова, Н.И. Соболева. – Текст (визуальный): непосредственный // Материалы шестого Национального конгресса терапевтов. – М.: Бионика, 2011. – С. 53.

17. Губский, Ю.И. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях: обзор литературы / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, С.В. Павлов. – Текст (визуальный): непосредственный // Современные проблемы токсикологии. – 2005. – Т.8, №3. – С. 20-26.

18. Давыдчик, Э.В. Взаимосвязь гипергомоцистеинемии с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом / Э.В. Давыдчик, В.А. Снежицкий, Л.В. Никонова. – Текст (визуальный): непосредственный // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2015. – № 1 (49). – С. 9-13.

19. Диагностика и лечение мужского бесплодия у больных распространённой патологией гениталий и паховой области / И.С. Собенников, Б.Н. Жиборев, С.Я. Котанс, А.А. Черенков. – Текст (визуальный): непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2017. – Т.25, №3. – С. 460-468.

20. Диагностика и лечение синдрома хронической тазовой боли у мужчин / Е.Б. Мазо, Г.Г. Кривобородов, М.Е. Школьников, М.А. Горчханов. – Текст (визуальный): непосредственный // Лечащий врач. – 2004. – №9. – С. 26-30.

21. Диагностика хронического абактериального простатита / З.А. Кадыров, В.С. Степанов, Ш.В. Рамишвили, Ш.Г. Машанеишвили. – Текст (визуальный): непосредственный // Андрология и генитальная хирургия. – 2019. – Т.20, №3. – С. 36-42.

22. Дилакян, Э.А. Лизосомные цистеиновые протеиназы при неопластической трансформации / Э.А. Дилакян, И.В. Цветкова. – Текст (визуальный): непосредственный // Биомедицинская химия. – 2005. – Т.51, вып. 5. – С. 485-500.

23. Диоксины и окислительно-восстановительный статус эякулята: есть ли связь с фертильностью? / С.Ш. Галимова, А.Ф. Гайсина, О.Ю. Травников, Э.Ф. Галимова. – Текст (визуальный): непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2018. – Т.6, №2. – С. 259-266.

24. Долгов, А.Б. Хронический абактериальный простатит / синдром хронической тазовой боли: современный взгляд на аспекты патогенеза / А.Б. Долгов, В.М. Попков, А.А. Чураков. – Текст: электронный // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – №4. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=24970> (дата обращения: 05.04.2023).

25. Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина. – Текст (визуальный): непосредственный // Украинский биохимический журнал. – 2008. – Т.80, №6. – С.5-18.

26. 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.: Изд-во «Медицинская пресса», 2006. – 400 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

27. Дубинина, Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса / Е.Е. Дубинина. – Текст (визуальный): непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т.47, №6. – С. 561-581.

28. Евдокимов, В.В. Влияние факторов различной природы на фертильность эякулята *in vitro* / В.В. Евдокимов, Н.К. Исаев, В.Б. Туровецкий. – Текст (визуальный): непосредственный // Андрология и генитальная хирургия. – 2022. – Т.23, №1. – С. 45-52.

29. Епанчинцева, Е.А. Комплексный анализ эякулята мужчин из бесплодных пар в возрастном аспекте / Е.А. Епанчинцева, В.Г. Селятицкая, С.В. Янковская. – Текст (визуальный): непосредственный // Андрология и генитальная хирургия. – 2021. – Т.22, №3. – С. 56-69.

30. Ефремов, Е.А. Актуальные и перспективные методы лечения идиопатического мужского бесплодия / Е.А. Ефремов, Е.В. Касатонова. – Текст (визуальный): непосредственный // Андрология и генитальная хирургия. – 2022. – Т.23, №3. – С. 48-53.

31. Залесская, Т.И. Перекисное окисление белков плазмы крови у больных глаукомой / Т.И. Залесская, И.И. Авер, К.А. Мандрик. – Текст (визуальный): непосредственный // Журнал ГрГМУ. – 2007. – №3 – С. 66-68.

32. Каражанова, Л.К. Гипергомоцистеинемия как фактор риска сердечнососудистых заболеваний (обзор литературы) / Л.К. Каражанова, А.С. Жунуспекова. – Текст (визуальный): непосредственный // Наука и здравоохранение. – 2016. – №4. – С. 129-144.

33. Клинические аспекты гипергомоцистеинемии: монография / В.А. Снежицкий, А.В. Пырочкин, В.В. Спас [и др.]; под общей редакцией В.А. Снежицкого, В.М. Пырочкина. – Гродно: ГрГМУ, 2011. – 292 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

34. Клинические рекомендации по андрологической урологии / под ред. П.А. Щеплева. – М.: Медфорум, 2016. – 120 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

35. Коровин, М.С. Роль лизосомальных цистеиновых протеиназ в опухолевой прогрессии / М.С. Коровин, В.В. Новицкий, О.С. Васильева. – Текст (визуальный): непосредственный // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – №2. – С. 85-91.

36. Кравцова, Е.Ю. Окислительная модификация белков как биохимический маркер прогноза ишемического инсульта / Е.Ю. Кравцова, Д.Ю. Соснин, Г.А. Мартынова. – Текст (визуальный): непосредственный // Медицинский альманах. – 2012. – №2. – С. 95-97.

37. Кравченко, Ю.В. Исследование системы антиокислительной защиты в условиях алиментарно индуцированного окислительного стресса / Ю.В. Кравченко, Г.Ю. Мальцев, А.В. Васильев. – Текст (визуальный): непосредственный // Биомедицинская химия. – 2009. – Т.50, №5. – С. 477-483.

38. Кудлаева, А.М. Влияние L-аргинина и L-карнитина на окислительную модификацию лизосомальных белков печени крыс / А.М. Кудлаева, М.А. Фомина, С.А. Исаков. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник Удмуртского университета. – 2017. – Т.27, №3. – С. 368-374.

39. Кузнецова, В.Л. Оксид азота: свойства, биологическая роль, механизмы действия / В.Л. Кузнецова, А.Г. Соловьева. – Текст: электронный // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=21037> (дата обращения: 11.12.2022).

40. Куликов, В.Ю. Роль окислительного стресса в регуляции метаболической активности внеклеточного матрикса соединительной ткани (обзор) / В.Ю. Куликов. – Текст: электронный // Медицина и образование в Сибири: электронный научный журнал. – 2009. – №4. – URL: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=363 (дата обращения: 15.11.2022).

41. Ланкин, В.З. Важная роль свободнорадикальных процессов в этиологии и патогенезе атеросклероза и сахарного диабета / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе. – Текст (визуальный): непосредственный // Кардиология. – 2016. – №12. – С. 97-105.

42. Ланкин, В.З. Окислительный и карбонильный стресс при атеросклерозе и диабете / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе. – Текст : электронный // Международная конференция, Минск тезисы докладов Пленарного заседания (25 - 26 июня 2015 г.). – 2015. – С. 16-18. – URL: elib.bsu.by/bitstream/123456789/119724/1/16 (дата обращения: 15.10.2022).

43. Медведев, Д.В. Молекулярные механизмы токсического действия гомоцистеина / Д.В. Медведев, В.И. Звягина. – Текст (визуальный): непосредственный // Кардиологический вестник. – 2017. – Т.12, №1. – С. 52-57.

44. Медведев, Д.В. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс / Д.В. Медведев, В.И. Звягина, М.А. Фомина. – Текст (визуальный): непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2014. – Т.22, №4. – С. 42-46.

45. Метаболический синдром / под ред. чл.-корр. РАМН Г.Е. Ройтберга. – М.: МЕДпресс-информ, 2007. – 224 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

46. Метельская, В.А. Скрининг – метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова. – Текст (визуальный): непосредственный // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – №6. – С. 15-18.

47. Механизмы окислительной модификации липопротеидов низкой плотности при окислительном и карбонильном стрессах / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, В.И. Капелько [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Биохимия. – 2007. – Т.72. – С. 1330-1341.

48. Молекулярные аспекты влияния комплекса Сперотон на мужскую фертильность при идиопатическом бесплодии / Ш.Н. Галимов, Р.М. Ахметов, Э.Ф. Галимова [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Урология. – 2017. – №2. – С. 88-92.

49. Молекулярные механизмы мужского бесплодия: основные направления научного поиска / Ш.Н. Галимов, Ю.Ю. Громенко, К.Ш. Галимов [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Урология. – 2022. – №4. – С. 114-117.

50. Молекулярный стресс и хронические нарушения обмена веществ / Э.А. Юрьева, Н.Н. Новикова, В.В. Длин, Е.С. Воздвиженская. – Текст (визуальный): непосредственный // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2020. – Т.65, №5. – С. 12-22.

51. Мужское бесплодие: молекулярные и иммунологические аспекты / Ш.Н. Галимов, В.А. Божедомов, Э.Ф. Галимова [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 208 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

52. Наумов, А.В. Гомоцистеин. Медико-биологические проблемы: монография / А.В. Наумов. – Минск: Профессиональные издания, 2013. – 311 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

53. Некоторые аспекты кардиопротективного действия потенциального антиангинального препарата "МТ" при моделировании острой ишемии миокарда / И.С. Чекман, Ю.М. Колесник, И.А. Мазур [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Запорожский медицинский журнал. – 2010. – Т.12, №5. – С. 198-202.

54. Никитина, Ю.В. Изменения окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс в раннем онтогенезе / Ю.В. Никитина. – Текст (визуальный): непосредственный // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2009. – Т.6, №1. – С. 124-131.

55. Овчинников, Р.И. Мужское бесплодие, связанное с окислительным стрессом сперматозоидов: патогенез и терапевтический подход / Р.И. Овчинников. – Текст: электронный // Медицинский совет. – 2022. – Т.16, №5. – С. 46-53. – URL: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-5-46-53> (дата обращения: 29.10.2022).

56. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Ключев [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Фундаментальные исследования. – 2010. – №1. – С. 74-78.

57. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, И.Г. Порогов. – Текст (визуальный): непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т.41, №1. – С. 24-26.

58. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин [и др.]. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

59. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков [и др.]. – М.: Слово, 2006. – 553 с. – Текст (визуальный): непосредственный.
60. Оксидативный стресс сперматозоидов: клиническое значение и коррекция / С.И. Гамидов, Т.В. Шатылко, А.Ю. Попова [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Медицинский совет. – 2021. – №3. – С. 19-27.
61. Осадчий, Л.В. Влияние простатита и варикоцеле на репродуктивные показатели молодых мужчин / Л.В. Осадчий, А.В. Попова, Н.А. Ворошила. – Текст (визуальный): непосредственный // Экспериментальная и клиническая урология. – 2014. – №2. – С. 77-81.
62. Особенности функционирования митохондрий миокарда у крыс со спонтанной гипертензией (SHR) на фоне экспериментального сахарного диабета и атеросклероза / М.Ю. Колесник, И.Ф. Беленичев, Г.В. Дзяк, И.С. Чекман. – Текст (визуальный): непосредственный // Запорожский медицинский журнал. – 2012. – Т.71, №2. – С. 26-30.
63. Паунова, С.С. Апоптоз – физиология и патология: обзор литературы / С.С. Паунова. – Текст (визуальный): непосредственный // Нефрология и диализ. – 2004. – Т.6, №2. – С.132-137.
64. Перекисное окисление липидов как патогенетическая основа развития эндотелиальной дисфункции / Д.А. Зобова, С.А. Козлова, Т.К. Парамонова, Н.А. Тюрина. – Текст (визуальный): непосредственный // Medicus. – 2016. – Т.3, №9. – С. 21-22.
65. Пичугова, С.В. Влияние варикоцеле на показатели спермограммы в подростковом возрасте / С.В. Пичугова. – Текст: электронный // Репродуктивное здоровье детей и подростков. – 2022. – Т.18, №1. – С. 73-83. – URL: <https://www.doi.org/10.33029/1816-2134-2022-18-1-73-83>(дата обращения: 29.12.2022).
66. Показатели сперматогенеза, гормонального и метаболического статуса у мужчин разных возрастных групп на Европейском севере России / Л.В. Осадчук, М.А. Клещев, Е.В. Типисова, А.В. Осадчук. – Текст: электронный //

Физиология человека. – 2019. – Т.45, № 3. – С. 107-114. – URL: https://doi.org/10.1134/S0131164619_02007 (дата обращения: 25.09.2022).

67. Пупышев, А.Б. Лизосомальные болезни накопления в Европе: проблема нейродегенерации и новые возможности терапевтических воздействий / А.Б. Пупышев. – Текст (визуальный): непосредственный // Сибирский научный медицинский журнал. – 2016. – №2. – С. 35-43.

68. Пупышев, А.Б. Пермеабилитация лизосомальных мембран как апоптогенный фактор / А.Б. Пупышев. – Текст (визуальный): непосредственный // Цитология. – 2011. – Т.53, №4. – С. 313-324.

69. Реутов, В.П. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина. – Текст (визуальный): непосредственный // Биохимия. – 1998. – Т.63, №7. – С. 1029-1040.

70. Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза / Г.А. Яровая, Е.А. Нешкова, Е.А. Мартынова, Т.Б. Блохина. – Текст (визуальный): непосредственный // Лабораторная медицина. – 2011. – №11. – С. 39-52.

71. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека / пер. с англ. яз. Н.П. Макаров; науч. ред. Л.Ф. Курило. – М.: Изд-во «КАПИТАЛ ПРИНТ», 2012. – 305 с. – ISBN 978-5-905106-09-05. – Текст (визуальный): непосредственный.

72. Сивков, А.В. Хронический простатит категории ПШВ/ синдром хронической тазовой боли и сексуальные дисфункции / А.В. Сивков, В.В. Ромих, А.В. Захарченко. – Текст (визуальный): непосредственный // Андрология и генитальная хирургия. – 2015. – № 4. – С. 18-26.

73. Ступницкий, М.А. Показатели оксидативного стресса как ранние критерии оценки состояния пациентов с тяжелой сочетанной торакальной травмой / М.А. Ступницкий. – Текст (визуальный): непосредственный // Политравма. – 2014. – №2. – С. 42-47.

74. Торопцева, М.В. Роль оксидативного стресса в патогенезе мужского бесплодия / М.В. Торопцева, Н.А. Липатова, В.А. Божедомов. – Текст

(визуальный): непосредственный // Материалы XIX международной конференции Российской ассоциации репродукции человека. – Иркутск, 2009. – С. 86-87.

75. Тугушева, Ф.А. Оксидативный стресс и его участие в неимунных механизмах прогрессирования хронической болезни почек / Ф.А. Тугушева. – Текст (визуальный): непосредственный // Нефрология. – 2009. – Т.13, №3. – С. 15-24.

76. Филиппова, О.В. Антиоксиданты как способ повышения мужской фертильности / О.В. Филиппова. – Текст (визуальный): непосредственный // Эффективная фармакотерапия. – 2020. – Т.16, №3. – С. 26-32.

77. Фомина, М.А. Влияние L-карнитина *in vitro* на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ и состояние лизосомальных мембран / М.А. Фомина, М.А. Кудлаева, А.Н. Рябков. – Текст (визуальный): непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2017. – Т.1, №25. – С. 14-20.

78. Фомина, М.А. Лизосомальные цистеиновые протеиназы в условиях окислительного стресса: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Фомина Мария Алексеевна; Рязанский государственный медицинский университет. – Рязань, 2018. – 280 с. – Текст (визуальный): непосредственный.

79. Фомина, М.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. – М.; Рязань, 2014. – 61с. – Текст (визуальный): непосредственный.

80. Хапалюк, А.В. Витамин В₁₂: биологическое значение, патогенетические механизмы и клинические проявления витаминной недостаточности / А.В. Хапалюк. – Текст (визуальный): непосредственный // Лечебное дело. – 2019. – Т.68, №4. – С. 17-23.

81. Цистеиновые катепсины: перспективы применения в диагностике и терапии злокачественных опухолей (обзор) / А.И. Петушкова, Л.В. Савватеева,

Д.О. Королев, А.А. Замятнин. – Текст (визуальный): непосредственный // Биохимия. – 2019. – Т.84, №7. – С. 953-971.

82. Цыбиков, Н.Н. Роль гомоцистеина в патологии человека / Н.Н. Цыбиков, Н.М. Цыбикова. – Текст (визуальный): непосредственный // Успехи современной биологии. – 2007. – Т.127, № 5. – С. 471-482.

83. Abasalt, H.C. Lipid peroxidation and large-scale deletions of mitochondrial DNA in asthenoteratozoospermic patients/ H.C. Abasalt, J.S Gholamali, G.C. Maryam. – Text: visual // Indian journal of biochemistry & biophysics. – 2013. – V.50, №6. – P. 492-499.

84. Arab, D. Dietary supplements in the management of varicoceleinduced infertility: A review of potential mechanisms / D. Arab, H. Doustmohammadi, A. Ardestani Zadeh. – Text: visual // Andrologia. – 2021. – V.53, №1. – P. e13879.

85. Asthenozoospermia: Cellular and molecular contributing factors and treatment strategies / S. Shahrokhi, P. Salehi, A. Alyasin [et al.]. – Text: visual // Andrologia. – 2019. – V.52, №2. – P. 1-11.

86. Baraibar, M.A. Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging / M.A. Baraibar, R. Ladouce, B. Friguet. – Text: visual // Journal of Proteomics. – 2013. – V.92. – P. 67-70.

87. Barati, E. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management / E. Barati, H. Nikzad, M. Karimian. – Text: electronic // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2020. – V.77, №1. – P. 93-113. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03253-8> (date of the application: 24.07.2022).

88. Barrett, A.J. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L / A.J. Barrett, H. Kirschke. – Text: visual // Methods in Enzymology. – 1981. – V.80. – P. 535-561.

89. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization / A.E. Feldstein, N.W. Werneburg, Z. Li [et al.]. – Text: visual // American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology. – 2006. – V.290. – P. G1339-G1346.

90. Biomarkers of oxidative damage in human disease / I. Dalle-Donne, R. Rossi, R. Colombo [et al.]. – Text: visual // *Clinical Chemistry*. – 2006. – V.32. – P.601-623.
91. Bivik, C. JNK mediates UVB-induced apoptosis upstream lysosomal membrane permeabilization and Bcl-2 family proteins / C. Bivik, K. Ollinger. – Text: visual // *Apoptosis*. – 2008. – V.13. – P. 1111-1120.
92. British Association of Urological Surgeons and the British Fertility Society. A review of varicocele treatment and fertility outcomes / A. Maheshwari, A. Muneer, M. Lucky [et al.]. – Text: visual // *Hum. Fertil. (Camb)*. – 2020. – P. 1-8.
93. Cai, Z. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health / Z. Cai, L.-J. Yan. – Text: visual // *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*. – 2013. – V.1, №1. – P. 15-26.
94. Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome - cell line P39 / T. Hishita, S. Tada-Oikawa, K. Tohyama [et al.]. – Text: visual // *Cancer Research*. – 2001. – V.61. – P. 2878-2884.
95. Cathepsin B inactivation attenuates hepatocyte apoptosis and liver damage in steatotic livers after cold ischemia — warm reperfusion injury / E.S. Baskin-Bey, A. Canbay, S.F. Bronk [et al.]. – Text: visual // *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. – 2005. – V.288, №2. – P.396-402.
96. Cathepsin H mediates the processing of talin and regulates migration of prostate cancer cells / Z. Jevnikar, M. Rojnik, P. Jamnik [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – V.288, №4. – P. 2201-2209.
97. Cathepsin S in tumours, regional lymph nodes and sera of patients with lung cancer: relation to prognosis / J. Kos, A. Sekirnik, G. Kopitar [et al.]. – Text: visual // *British Journal of Cancer*. – 2001. – V.85, №8. – P. 1193-1200.
98. Cathepsins K, L, B, X and W are differentially expressed in normal and chronically inflamed gastric mucosa / F. Buhling, U. Peitz, S. Kruger [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V.385. – P. 439-445.

99. Chatterjee, S. Medical management of male infertility /S. Chatterjee, R. Chowdhury, B. Khan. – Text: visual // Journal of the Indian Medical Association. – 2006. – V.104, №2. – P. 74; 76-77.
100. Cho, C.-L. Indications and outcomes of varicocele repair / C.-L. Cho, S.C. Esteves, A. Agarwal. – Text: visual // Panminerva Medica. – 2019. – V.61, №2. – P. 152-163.
101. Clinical experience with methylcobalamin (CH₃-B₁₂) for male infertility/ R. Isoyama, S. Kawai, Y. Shimizu [et al.]. – Text: visual // Hinyokika Kyo. – 1984. – V.30, №4. – P. 581-586.
102. Comparison of seminal vitamin B₁₂, folate, reactive oxygen species and various sperm parameters between fertile and infertile males / Q. Chen, V. Ng, J. Mei, S.E. Chia. – Text: visual // Wei Sheng Yan Jiu. – 2001. – V.30. – P. 80-82.
103. Comprehensive Analysis of Global Research on Human Varicocele : A Scientometric Approach / A. Agarwal, R. Finelli, D. Durairajanayagam [et al.]. – Text: visual // The World journal of Men's Health. – 2022. – V.40, №4. – P. 636-652.
104. Consensus and diversity in the management of varicocele for male infertility: results of a global practice survey and comparison with guidelines and recommendations / R. Shah, A. Agarwal, P. Kavoussi [et al.]. – Text: visual // The World journal of Men's Health. – 2022. – V.41, №1. – P. 164-197.
105. Correlation of oxidation-reduction potential with hormones, semen parameters and testicular volume / M. Arafa, R. Henkel, A. Agarwal [et al.]. – Text: electronic // Andrologia. – 2019. – V.51, №5. – P. e13258. – URL: <https://doi.org/10.1111/and.13258> (date of the application: 27.08.2022).
106. Crystal structure of the wild-type human procathepsin B at 2.5 Å resolution reveals the native active site of a papain-like cysteine protease zymogen / M. Podobnik, R. Kuhelj, V. Turk, D. Turk. – Text: visual // Journal Molecular Biology. – 1997. – V.271. – P. 774-788.
107. Cyclic supplementation of 5-MTHF is effective for the correction of hyperhomocysteinemia / P. Ambrosino, R. Lupoli, A. Di Minno [et al.]. – Text:

electronic // Nutrition Research. – 2015. – V.35. – P.489-495. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25841618> (date of the application: 11.06.2021).

108. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers / V. Turk, V. Stoka, O. Vasiljeva [et al.]. – Text: visual // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012. – V.1824, № 1. – P. 68-88.

109. Cysteine modification by lipid peroxidation products inhibits protein disulfide isomerase / D.L. Carbone, J.A. Doorn, Z. Kiebler, D.R. Petersen. – Text: visual // Chemical Research in Toxicology. – 2005. – V.18, №8. – P.1324-1331.

110. Den Heijer, M. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a metaanalysis of published epidemiological studies / M. Den Heijer, S. Lewington, R. Clarke. – Text: electronic // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2005. – V.3. – P. 292-299. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15670035> (date of the application: 14.08.2022).

111. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R. L. Levine, D. Garland, C. N. Oliver [et al.]. – Text: visual // Methods in enzymology. – 1990. – V.186. – P. 464-478.

112. Dhillon, V. Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CPG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in indian men / V. Dhillon, M. Shahid, S. Husain. – Text: visual // Molecular Human Reproduction. – 2007. – V.13, №4. – P. 213-222.

113. Dietary sources of vitamin B₁₂ and their association with vitamin B₁₂ status markers in healthy older adults in the B-PROOF study / E. Brouwer-Brolsma, R. Dhonukshe-Rutten, J. van Wijngaarden [et al.]. – Text: visual // Nutrients. – 2015. – V.7, №9. – P. 7781-7797.

114. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality / S. Benedetti, M.C. Tagliamonte, S. Catalani [et al.]. – Text: visual // Reprod. Biomed. Online. – 2012. – V.25, №3. – P. 300-306.

115. DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases / H. Lu , X. Liu, Y. Deng, H. Qing. – Text: visual // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2013. – V.85, №5. – P. 1-16.
116. Effect of alcohol intake and cigarette smoking on sperm parameters and pregnancy / A.M. De Jong, R. Menkveld, J.W. Lens [et al.]. – Text: visual // *Andrologia*. – 2014. – V.6, №2. – P. 112-117.
117. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study / R.A. Saleh, A. Agarwal, R.K. Sharma [et al.]. – Text: visual // *Fertility and Sterility*. – 2002. – V.78. – P. 491-499.
118. 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. Gosalvez [et al.]. – Text: visual // *Andrologia*. – 2013. – V.45. – P. 211-216.
119. ESeroS-GS Protects Neuronal Cells from Oxidative Stress by Stabilizing Lysosomes / N. Yang, Q. Chen, X. He [et al.]. – Text: visual // *Molecules*. – 2016. – V.21, №6. – P. 637.
120. Evaluation of sperm DNA fragmentation index, zinc concentration and seminal parameters from infertile men with varicocele / T.T. Nguyen, T.S. Trieu, T.O. Tran, T.L.A. Luong. – Text: electronic // *Andrologia*. – 2019. – V.51, №2. – P. e13184. – URL: <https://doi.org/10.1111/and.13184> (date of the application: 24.04.2022).
121. Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress / G.R. Smith, G.H. Kaune, C.D. Parodi [et al.]. – Text: visual // *Revista Medica de Chile*. – 2007. – V.135. – P. 279-286.
122. Finkelstein, J. Homocysteine / J. Finkelstein, J. Martin. – Text: visual // *The International Journal of Biochemistry at Cell Biology*. – 2000. – V.32, №4. – P. 385-389.
123. Folic Acid and Homocysteine in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease Progression: Which Comes First? / G. Cianciolo, A. De Pascalis, L. Di Lullo [et al.]. – Text: electronic // *Cardiorenal Medicine*. – 2017. – V.7,

№4. – P. 255-266. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29118764> (date of the application: 22.08.2022).

124. Forstermann, U. Nitric oxide synthases regulation and function / U. Forstermann, W. Sessa. – Text: visual // *European Heart Journal*. – 2012. – V.33, №7. – P. 829-837.

125. Francisco, I.F. Peripheral nitric oxide signaling directly blocks inflammatory pain / I.F. Francisco Gomes, Q.C. Fernando, M.C. Thiago. – Text: visual // *Biochemical Pharmacology*. – 2020. – V. 176. – P. e:113862.

126. Fretz, P.C. Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment / P.C. Fretz, J.I. Sandlow. – Text: visual // *Urologic Clinics of North America*. – 2002. – V.29, №4. – P. 921-937.

127. Gaynullina, D.K. Changes in endothelial nitric oxide production in systemic vessels during early ontogenesis - a key mechanism for the perinatal adaptation of the circulatory system / D.K. Gaynullina, R. Schubert, O.S. Tarasova. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V.20, №6. – P. 1421.

128. Genestra, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants / M. Genestra. – Text: visual // *Cell Signal*. – 2007. – V.19, № 9. – P. 1807-1819.

129. Genetic variants in varicocele-related male infertility : a systematic review and future directions / T. Mostafa, I. Abdel-Hamid, M. Taymour, O. Ali. – Text: visual // *Hum. Fertil. (Camb)*. – 2021. – P. 1-17.

130. Glowacki, R. Cross-talk between Cys34 and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation / R. Glowacki, H. Jakubowski. – Text: electronic // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V.279, №12. – P.10864-10870. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14701829> (date of the application: 02.10.2021).

131. Goldberg, A.L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins / A.L. Goldberg. – Text: visual // *Nature*. – 2003. – V.426. – P. 895-899.

132. Grade 3 varicocele in fertile men: a different entity / M. Cocuzza, K.S. Athayde, C. Alvarenga [et al.]. – Text: visual // *The Journal of Urology*. – 2012. – V.187, №4. – P. 1363-1368.
133. Grossypol inhibition of acrosin and proacrosin, and oocyte penetration by human spermatozoa / W.P. Kennedy, H.H. Vander Ven, J.W. Straus [et al.]. – Text: visual // *Biol Reprod*. – 1983. – V.29. – P. 999-1009.
134. Gujadhur, R. Careful assesment key in managing prostatitis / R. Gujadhur, J. Aning. – Text: visual // *Practitioner*. – 2015. – V.259, № 1781. – P. 9-15.
135. Hamada, A. Varicocele and Male Infertility: Current Concepts, Controversies and Consensus / A. Hamada, S.C. Esteves, A. Agarwal. – Springer International Publishing, 2016. – Text: visual.
136. Hasilik, A. Intracellular trafficking of lysosomal proteins and lysosomes / A. Hasilik, C. Wrocklage, B. Schroder. – Text: visual // *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. – 2009. – V.47. – P. S18-S33.
137. High levels of circulating folate concentrations are associated with DNA methylation of tumor suppressor and repair genes p16, MLH1, and MGMT in elderly Chileans / H. Sanchez, M.B. Hossain, L. Lera [et al.]. – Text: electronic // *Clin Epigenetics*. – 2017. – V.9. – P. 24. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28748002> (date of the application: 02.05.2022).
138. Hind, G. Left varicocele revealing a nutcracker phenomenon / G. Hind, B. Najwa. – Text: visual // *Pan African Medical Journal*. – 2021. – V.39. – P. 131.
139. Histone retention, protein carbonylation, and lipid peroxidation in spermatozoa: Possible role in recurrent pregnancy loss / G. Mohanty, N. Swain, C. Goswami [et al.]. – Text: visual // *Systems Biology in Reproductive Medicine*. – 2016. – Jun. – P. 201-212.
140. Homocysteine Impairs the Nitric Oxide Synthase Pathway: Role of Asymmetric Dimethylarginine / M. Stuhlinger, P. Tsao, J. Her [et al.]. – Text: visual // *Circulation*. – 2001. – V.104, №21. – P. 2569-2575.
141. Homocysteine Induces Cardiomyocyte Dysfunction and Apoptosis through p38 MAPK-Mediated Increase in Oxidant Stress / X. Wang, L. Cui, J. Joseph [et al.]. –

Text: visual // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2012. – V.52, №3. – P.753-760.

142. Homocysteine is associated with exaggerated morning blood pressure surge in patients with acute ischemic stroke / X. Jun-Chao, L. Ying-Ying, L. Xiao-Hui [et al.]. – Text: electronic // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. – 2018. – V.27, №10. – P. 2650-2656. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.05.032> (date of the application: 23.09.2022).

143. How does heparin prevent the pH inactivation of cathepsin B? Allosteric mechanism elucidated by docking and molecular dynamics / M. G S Costa, P. R Batista, C. S Shida [et al.]. – Text: visual // *BMC Genomics*. – 2010. – V.11 (Suppl 5). – P. S5.

144. Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsin L and S but not by autocatalytic processing / S.W. Dahl, T. Halkier, C. Lauritzen [et al.]. – Text: visual // *Biochemistry*. – 2001. – V.40. – P. 1671-1678.

145. Huntington, J.A. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation / J.A. Huntington, R.J. Read, R.W. Carrell. – Text: visual // *Nature*. – 2000. – V.407. – P. 923-926.

146. Induction of Lysosomal Biogenesis in Atherosclerotic Macrophages Can Rescue Lipid-Induced Lysosomal Dysfunction and Downstream Sequelae / R. Emanuel, I. Sergin, S. Bhattacharya [et al.]. – Text: visual // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2014. – V.34, №9. – P. 1942-1952.

147. Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats / J. Zhou, L. May, P. Liao [et al.]. – Text: visual // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2009. – V.29. – P. 863-869.

148. Investigation and treatment of the infertile male / A. Halim, D. Antoniou, P.W. Leedham [et al.]. – Text: visual // *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. – 1973. – V.6. – P. 373-378.

149. Jakubowski, H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A mechanism against protein n-homocysteinylation / H.

Jakubowski. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – V.275, №6. – P. 3957-3962.

150. Jakubowski, H. Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites / H. Jakubowski, R. Głowacki. – Text: electronic // Advances in Clinical Chemistry. – 2011. – V.55. – P. 81-103. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22126025> (date of the application: 20.04.2022).

151. Jakubowski, H. Translational Incorporation of S-Nitrosohomocysteine into Protein / H. Jakubowski. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – V.275, №29. – P. 21813-21816.

152. Jehle, A. The interplay between cGMP and calcium signaling in Alzheimer's disease / A. Jehle, O. Garaschuk. – Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – V.23, №13. – P. e: 7048.

153. Jevnikar, Z. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology / Z. Jevnikar, J. Kos. – Text: electronic // Open access journal. – 2008. – V.12, №2. – URL: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_CTSH.html (date of the application: 12.08.2022).

154. Kogan, M.I. Relationship of low urinary tract symptoms and chronic pelvic pain syndrome in men with pelvic hemodynamic disorders / M.I. Kogan, I.I. Belousov, A. Afoko // European Urology Supplements. – 2009. – V.8, №4. – P. 258.

155. Koh, T.J. Nitric oxide inhibits calpain-mediated proteolysis of talin in skeletal muscle cells / T.J. Koh, J.G. Tidball. – Text: visual // American Journal of Physiology- Cell Physiology. – 2000. – V.279. – P. 806-812.

156. Krausz, C. Genetics of male infertility / C. Krausz, A. Riera-Escamilla. – Text: visual // Nature reviews. Urology. – 2018. – V.15, №6. – P. 369-384.

157. Kumar, M. Sperm and seminal plasma proteomics: molecular changes associated with varicocele-mediated male infertility / M. Kumar, P. Selvam, A. Agarwal. – Text: electronic // The World journal Men's Health. – 2020. – V.38, №4. – P. 472-483. – URL: <https://doi.org/10.5534/wjmh.190018> (date of the application: 25.11.2022).

158. L-Arginine and tetrahydrobiopterin supported nitric oxide production is crucial for the microbicidal activity of neutrophils / S. Nagarkoti, S. Sadaf, D. Awasthi [et al.]. – Text: visual // *Free Radical Research*. – 2019. – Vol.53, №3. – P. 281-292.
159. Lee, N.P. Nitric oxide and cyclic nucleotides: their roles in junction dynamics and spermatogenesis / N.P. Lee, C.Y. Cheng. – Text: visual // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2008. – V.636. – P. 172-285.
160. Lewis, S.E.M. What does a varicocele do to a man's fertility? There is much more than meets the eye / S.E.M. Lewis, S.C. Esteves. – Text: visual // *Internatijnal Braz. J. Urol.* – 2021. – V.47, №2. – P. 284-286.
161. Lysosomal Labilization / A. Terman, T. Kurz, B. Gustafsson, U.T. Brunk. – Text: visual // *IUBMB Life*. – 2006. – V.58, №9. – P. 531-539.
162. Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis – involvement of Bax? / K. Kagedal, A.-C. Johansson, U. Johansson [et al.]. – Text: visual // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2005. – V.86. – P. 309-321.
163. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death / U. Repnik, V. Stoka, V. Turk, B. Turk. – Text: visual // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – V.1824, № 1. – P.22-33.
164. Madamanchi, N.R. Oxidative stress and vascular disease / N.R. Madamanchi, A. Vendrov, M.S. Runge. – Text: visual // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2005. – V.25, № 1. – P. 29-38.
165. Madamanchini, N. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. – Text: visual / N. Madamanchini, Z. Hakim, S. Runge. – Text: visual // *Journal of thrombosis and haemostasis*. – 2005. –V.3. – P. 254-267.
166. Martins, A.D. Oxidation reduction potential: a new biomarker of male infertility /A.D. Martins, A. Agarwal. – Text: electronic // *Panminerva Medica*. – 2019. – V.61, №2. – P. 108-117. – URL: <https://doi.org/10.23736/S0031-0808.18.03529-2> (date of the application: 26.06.2022).

167. Miraglia, E. Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic GMP/protein kinase G signaling pathway / E. Miraglia, F. De Angelis, E. Gazzano. – Text: visual // *Reproduction*. – 2011. – V.141, №1. – P. 47-54.
168. Modification of heat shock protein 90 by 4-hydroxynonenal in a rat model of chronic alcoholic liver disease / D.L. Carbone, J.A. Doorn, Z. Kiebler [et al.]. – Text: visual // *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2005. – V.315, №1. – P.8-15.
169. Modification of peptide and protein cysteine thiol groups by conjugation with a degradation product of ascorbate / P. Kay, J.R. Wagner, H. Gagnon [et al.]. – Text: visual // *Chemical Research in toxicology*. – 2013. – V.26, №9. – P.1333-1339.
170. Modulation of hypotensive effects of kinins by cathepsin K / F. Lecaille, C. Vandier, E. Gobat [et al.]. – Text: visual // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2007. – V.459. – P. 129-136.
171. Molecular characterisation and expression analysis of the cathepsin H gene from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) / J.-W. Kim, C.-I. Park, S.D. Hwang [et al.]. – Text: visual // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2013. – V.35, №1. – P.188-194.
172. Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk? / G. Aktan, S. Dogru-Abbasoglu, C. Küçükgergin [et al.]. – Text: visual // *Fertility and Sterility*. – 2013. – V.99, №5. – P. 1211-1215.
173. N-homocysteinylation impairs collagen cross-linking in cystathionine β -synthase-deficient mice: a novel mechanism of connective tissue abnormalities / J. Perla-Kajan, O. Utyro, M. Rusek [et al.]. – Text: visual // *FASEB Journal*. – 2016. – V.30, №11. – P. 3810-3821.
174. Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in PCD Signaling / V. Locato, A. Paradiso, W. Sabetta [et al.]. – Text: visual // *Advances in Botanical Research*. – 2016. – V.77. – P. 165-192.
175. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis / H. T. Chung, H.O. Pae, B.M. Choi [et al.]. – Text: visual // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2001. – V.282. – P. 1075-1079.

176. Nitric oxide synthase patterns in normal and varicocele testis in adolescents / G. Santoro, C. Romeo, P. Impellizzeri [et al.]. – Text: visual // *BJU International*. – 2001. – V.88. – P. 967-973.
177. Nitrogen monoxide: MAK Value Documentation, 2010. – Text: visual // *The MAK Collection for Occupational Health and Safety*. – 2014. – P.1-37.
178. Oral antioxidant treatment partly improves integrity of human sperm DNA in infertile grade I varicocele patients / J. Gual-Frau, C. Abad, M. J. Amengual [et al.]. – Text: visual // *Human. Fertility*. – 2015. – V.18, №3. – P. 225-229.
179. Over expression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer / G. Vazquez-Ortiz, P. Pina-Sanchez, K. Vazquez [et al.]. – Text: visual // *BMC Cancer*. – 2005. – V.5. – P. 68.
180. Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling / S.B. Wall, J.-Y. Oh, A.R. Diers, A. Landar. – Text: visual // *Frontiers in Physiology*. – 2012. – V.3. – P. 1-10.
181. Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation / Y. Niu, T. L. DesMarais, Z. Tong [et al.]. – Text: visual // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2015. – May. – P. 22-28.
182. Oxidative Stress: A Comprehensive Review of Biochemical, Molecular, and Genetic Aspects in the Pathogenesis and Management of Varicocele / R. Finelli, K. Leisegang, H. Kandil, A. Agarwal. – Text: visual // *The World journal of Men's Health*. – 2022. – V.40, №1. – P. 87-103.
183. Pack, S. Varicocele and Testicular Pain : A Review / S. Pack, W.S. Choi. – Text: visual // *The World journal of Men's Health*. – 2019. – V.37, №1. – P. 4-11.
184. Perla-Kajan, J. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans / J. Perla-Kajan, T. Twardowski, H. Jakubowski. – Text: visual // *Amino acids*. – 2007. – V.32, №4. – P. 561-572.
185. Pernicious anemia: Fundamental and practical aspects in diagnosis / A. Tun, K. Thein, Z. Myint, H. Thein. – Text: visual // *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. – 2017. – V.15, №1. – P.17-22.

186. Pontari, M.A. Mechanisms in prostatitis / chronic pelvic pain syndrome / M.A. Pontari, M.R. Ruggieri. – Text: visual // *Journal Urol.* – 2008. – May. – V.179 (5Suppl). – P. 61-67.
187. Prostatitis and male pelvic pain syndrome: diagnosis and treatment / F.M. Wagenlehner, K.G. Naber, T. Bschiepfer [et al.]. – Text: visual // *DtschArztebl Int.* – 2009. – V.106, №11. – P. 175-183
188. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress / I. Dalle-Donnea, R. Rossi, D. Giustarini [et al.]. – Text: visual // *Clinica Chimica Acta.* – 2003. – V.329. – P. 23-38.
189. Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling/ C.M. Wong, A.K. Cheema, L. Zhang, Y.J. Suzuki. – Text: visual // *Circulation Research.* – 2008. – V.102, № 3. – P.310-318.
190. Protein modifications by electrophilic lipoxidation products: Adduct formation, chemical strategies and tandem mass spectrometry for their detection and identification / Y.V. Vasil'ev, S.-C. Tzeng, L. Huang, C.S. Maier. – Text: visual // *Mass Spectrometry Reviews.* – 2013. – V.33, №3. – P. 157-182.
191. Protein oxidation: identification and utilisation of molecular markers to differentiate singlet oxygen and hydroxyl radical-mediated oxidative pathways / J.E. Plowman, S. Deb-Choudhury, A.J. Grosvenor, J.M. Dyer. – Text: visual // *Photochemical and Photobiological Sciences.* – 2013. – V.12, №11. – P.1960-1967.
192. Radi, R. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects / R. Radi. – Text: visual // *Accounts of Chemical Research.* – 2013. – V.46. – P. 550-559.
193. Recombinant human cathepsin H lacking the mini chain is an endopeptidase / O. Vasiljeva, M. Dolinar, V. Turk, B. Turk. – Text: visual // *Biochemistry.* – 2003. – V.42, №46. – P. 13522-13528.
194. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress / A.A. Zalata, A.H. Ahmed, S.S. Allamaneni [et al.]. – Text: visual // *Asia journal of andrology.* – 2004. – V.6. – P. 313-318.

195. Result of long-term methylcobalamin treatment for male infertility / A. Iwasaki, M. Hosaka, Y. Kinoshita [et al.]. – Text: visual // *Jpn. J. Fertil. Steril.* – 2003. – V.48. – P. 119-124.
196. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility / O. Adeoye, J. Olawumi, A. Opeyemi, O. Christiania. – Text: visual // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* – 2018. – V.22, №1. – P. 61-66.
197. Ritchie, C. Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility / C. Ritchie, E.Y. Ko. – Text: visual // *Andrologia.* – 2021. – V.53, №1. – P. e13581.
198. Role of Homocysteine in the Ischemic Stroke and Development of Ischemic Tolerance / J. Lehotský, B. Tothová, M. Kovalská [et al.]. – Text: electronic // *Front. Neurosci.* – 2016. – V.10. – P.17-25. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5120102/> (date of the application: 21.03.2021)
199. Role of nitric oxide in the cardiovascular and renal systems / A. Ahmad, S. Dempsey, Z. Daneva, M. Azam. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences Int.* – 2018. – V.9, №19. – P. e: 2605.
200. Role of oxidative stress in pathology of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and male infertility and antioxidants function in ameliorating oxidative stress/ U.A. Ihsan, F.U. Khan, P. Khongorzul [et al.]. – Text: visual // *Biomedicine and Pharmacotherapy.* – 2018. – V.106. – P. 714-723.
201. Role of oxidative stress in varicocele / K. Wang, Y. Gao, C. Wang [et al.]. – Text: visual // *Frontiers in Genetics.* – 2022. – V.23, №13. – P. 85-114.
202. Role of reactive nitrogen species in male infertility / S.B. Doshi, K. Khullar, R.K Sharma [et al.]. – Text: visual // *Reproductive Biology and Endocrinology.* – 2012. – V.109, №10. – P. 10:109.
203. Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism / Y. Xiao, X. Su, W. Huang [et al.]. – Text: electronic // *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2015. – V.67. – P. 158-166. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26117455> (date of the application: 15.10.2022).

204. Rosendaal, F.R. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior / F.R. Rosendaal. – Text: visual // Hematology: the American Society of Hematology Education Program. – 2005. – V.1. – P. 1-12.
205. Saftig, P. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function / P. Saftig, J. Klumperman. – Text: visual // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2009. – V.10. – P. 623-635.
206. Salisbury, D. Reactive oxygen and nitrogen species: impact on endothelial dysfunction / D. Salisbury, U. Bronas. – Text: visual // Nursing Research. – 2015. – V.64, № 1. – P. 53-66.
207. Santilli, F. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase, folate status and atherothrombosis: a mechanistic and clinical perspective / F. Santilli, G. Davì, C. Patrono. – Text: electronic // Vascul Pharmacol. – 2016. – V.78. – P. 1-9. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26111718> (date of the application: 09.12.2022).
208. Schöneich, C. Sulfur Radical-Induced Redox Modifications in Proteins: Analysis and Mechanistic Aspects / C. Schöneich. – Text: visual // Antioxidants & Redox Signaling. – 2017. – V.26, №8. – P. 388-405.
209. Seminal oxidation-reduction potential and sperm dna fragmentation index increase among infertile men with varicocele / T. Tanaka, Y. Kobori, K. Terai [et al.]. – Text: electronic // Hum. Fertil. (Camb.). – 2020. – V.20. – P. 1-5. – URL: <https://doi.org/10.1080/14647273.2020.1712747> (date of the application: 21.09.2022).
210. Seminal plasma cobalamin significantly correlates with sperm concentration in men undergoing IVF or ICSI procedures / J. Boxmeer, M. Smit, R. Weber [et al.]. – Text: visual // Journal Androl. – 2007. – V.28, №4. – P.521-527.
211. Serrano, C.A.Z. Diagnosis and hormonal treatment of male infertility / C.A.Z. Serrano, A.C. Obando. – Text: visual // Actas Urologicas Espanolas (English Edition). – 2020. – V.44, №5. – P. 321-327.
212. Shelton, P. The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene? / P. Shelton, A.K. Jaiswal. – Text: visual // FASEB Journal. – 2013. – V.27, № 2. – P.414-423.

213. Simultaneous determination of cobalt and nickel in vitamin B₁₂ samples using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry / F. Adolfo, P. do Nascimento, D. Bohrer [et al.]. – Text: visual // *Talanta*. – 2016. – V.147. – P. 241-245.
214. Sinclair, S. Male infertility: nutritional and environmental considerations / S. Sinclair. – Text: visual // *Alternative Medicine Review*. – 2000. – V.5, №1. – P. 28-38.
215. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA / C.G. Fraga, P.A. Motchnik, A.J. Wyrobek [et al.]. – Text: visual // *Mutation Research*. – 2008. – V.351. – P.199-203.
216. Spectroscopic study of the cobalamin-dependent methionine synthase in the activation conformation: Effects of the y1139 residue and S-adenosylmethionin on the B₁₂ cofactor / M. Liptak, S. Datta, R. Matthews, T.C. Brunold. – Text: visual // *Journal American Chemical Society*. – 2008. – V.130, №48. – P. 16374-16381.
217. Steed, M.M. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia / M.M Steed, S.C. Tyagi. – Text: visual // *Antioxidants & Redox Signal*. – 2011. – V.15, №7. – P. 1927-1943.
218. Stoka, V. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration / V. Stoka, V. Turk, B. Turk. – Text: visual // *Ageing Research Reviews*. – 2016. – №32. – P. 22-37.
219. Stoka, V. Lysosomal Cysteine Proteases: Structural Features and their Role in Apoptosis / V. Stoka, B. Turk, V. Turk. – Text: visual // *IUBMB Life*. – 2005. – V.57, №4/5. – P. 347-353.
220. Stress and its association with cardiometabolic disorders / I. Pérez-Torres, L. Manzano-Pech, M.E. Rubio-Ruíz [et al.]. – Text: visual // *Molecules*. – 2020. – Vol.25, №11. – P. e: 2555.
221. Structural and biological studies on bacterial nitric oxide synthase inhibitors / J.K. Holden, H. Li, Q. Jing [et al.]. – Text: visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – V.110, №45. – P. 18127-18131.

222. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment / R. Coulombe, P. Grochulski, J. Sivaraman [et al.]. – Text: visual // The EMBO Journal. – 1996. – V.15. – P. 5492-5503.

223. Su, J.S. Pathophysiology and treatment options of varicocele : An overview / J.S. Su, N.J. Farber, S.C. Vij. – Text: visual // Andrologia. – 2021. – V.53, №1. – P. e13576.

224. Takagi, H. Meta-analysis of circulating homocysteine levels in subjects with versus without abdominal aortic aneurysm / H. Takagi, T. Umemoto. – Text: electronic // International Angiology. – 2015. – V.34. – P. 229-237. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24732583> (date of the application: 22.12.2022).

225. Temple, A. Identification of Specific Protein Carbonylation Sites in Model Oxidations of Human Serum Albumin / A. Temple, T.-Y. Yen, S. Gronert. – Text: visual // Journal of the American Society for Mass Spectrometry. – 2006. – V.17, №8. – P. 1172-1180.

226. The association between body mass index and varicocele : A meta-analysis / G. Xiao-Bin, W. Fang-Lei, X. Hui [et al.]. – Text: visual // International Braz. J. Urol. – 2021. – V.47, №1. – P. 8-19.

227. The benefits of varicocele repair for achieving pregnancy in male infertility: A systematic review and meta-analysis / P. Birowo, W. Tendi, I. S. Widyahening [et al.]. – Text: visual // Heliyon. – 2020. – V.6, №11. – P. e05439.

228. The expression and activity of cathepsins D, H and K in asthmatic airways / A. Faiz, G. Tjin, L. Harkness [et al.]. – Text: visual // PLoS One. – 2013. – V.8, № 3. – P.e: 57245.

229. The immediate efficacy of inhaled nitric oxide treatment in preterm infants with acute respiratory failure during neonatal transport / F. Garrido, J.L. GonzalezCaballero, R. Lomax [et al.]. – Text: visual // Acta Paediatrica. – 2019. – V.109, №2. – P. 309-313.

230. The level of secondary messengers and the redox state of NAD⁺/NADH are associated with sperm quality in infertility / Sh.N. Galimov, E.F. Galimova, J.Y.

Gromenko [et al.]. – Text: electronic // Journal of Reproductive Immunology. – 2021. – V.148. – P. 103383. – URL: [https://doi.org/ 10.1016/j.jri.2021.103383](https://doi.org/10.1016/j.jri.2021.103383) (date of the application: 23.12.2022)

231. The lysosome-associated apoptosis-inducing protein containing the pleckstrin homology (PH) andFYVE domains (LAPF), representative of a novel family of PH andFYVE domain-containing proteins, induces caspase-independent apoptosis via the lysosomal-mitochondrial pathway / W. Chen, N. Li, T. Chen [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2005. – V.280. – P. 40985-40995.

232. The potential role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity in the testicular dysfunction associated with varicocele: an experimental study / K.I. Turker, T. Erdoğan, H. Gülkesen [et al.]. – Text: visual // International Urology and Nephrology. – 2004. – V.36. – P. 67-72.

233. The proinflammatory cytokines interleukin-1 α and tumor necrosis factor α promote the expression and secretion of proteolytically active cathepsin S from human chondrocytes / D. Caglič, U. Repnik, C. Jedeszko [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2013. – V.394, №2. – P. 307-316.

234. The role of Vitamin E – Selenium – Folic Acid Supplementation in Improving Sperm Parameters After Varicocelectomy : A Randomized Clinical Trial / A. Ardestani Zadeh, D. Arab, N.S. Kia [et al.]. – Text: visual // The Journal of Urology. – 2019. – V.16, №5. – P. 495-500.

235. Upregulation of cathepsin W expressing T cell is specific for autoimmune atrophic gastritis compared to other types of chronic gastritis / D. Kuester, M. Vieth, U. Peitz [et al.]. – Text: visual // World Journal of Gastroenterology. – 2005. – V.11. – P. 5951-5957.

236. Varicocele. Classification and pitfalls / M. Bertolotto, V. Cantisani, F.M. Drudi, F. Lotti. – Text: visual // Andrology. – 2021. – V.9, №5. – P. 1322-1330.

237. Wiederanders, B. Functions of propeptide parts of cysteine proteases / B. Wiederanders, G. Kaulmann, K. Schilling. – Text: visual // Current Protein and Peptide Science . – 2003. – V.4. – P. 309-326.

238. Xu, H. Lysosomal physiology / H. Xu, D. Ren. – Text: visual // *Annual Review of Physiology*. – 2015. – V.77. – P. 57-80.
239. Yadav, M. Comparative assessment of vitamin-B₁₂, folic acid and homocysteine levels in relation to p 53 expression in megaloblastic anemia / M. Yadav, N. Manoli, S. Madhunapantula. – Text: visual // *PLOS One*. – 2016. – V.11, №10. – P. 1-17.
240. Yaguchi, J. Evolution of nitric oxide regulation of gut function / J. Yaguchi, S. Yaguchi. – Text: visual // *PNAS*. – 2019. – V.116, №12. – P. 5607-5612.
241. Yan, L.J. Analysis of oxidative modification of proteins / L.J. Yan. – Text: visual // *Current protocols in protein science*. – 2009. – Unit14.4, Chapter 14. – P. 1-28.
242. Yan, H.H. Blood-testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors / H.H. Yan, C.Y. Cheng. – Text: visual // *PNAS*. – 2005. – V.102. – P. 11722-11727.