

## Мейоз, сперматогенез и ультраструктура базальной мембраны семенных канальцев у пациентов с азооспермией

Е.Е. Брагина<sup>1,2</sup>, И.И. Витязева<sup>3</sup>, М.А. Лелекова<sup>4</sup>, А.А. Кашинцова<sup>4</sup>, С.В. Боголюбов<sup>3</sup>,  
М.Ю. Габлия<sup>5</sup>, И.В. Виноградов<sup>5</sup>, В.Е. Спангенберг<sup>4</sup>, О.Л. Коломиец<sup>4</sup>

<sup>1</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 115522 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России; Россия, 117036 Москва, ул. Дмитрия Ульянова, 11;

<sup>4</sup>ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; Россия, 119991 Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3;

<sup>5</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

**Контакты:** Елизавета Ефимовна Брагина [bragor@mail.ru](mailto:bragor@mail.ru)

**Цель исследования** — выявить взаимосвязь аномалий мейоза и изменений ультраструктуры базальной мембраны (БМ) семенных канальцев у пациентов при выраженном нарушении сперматогенеза — азооспермии или тяжелой форме олигозооспермии.

**Материалы и методы.** Проведено электронно-микроскопическое исследование структуры БМ семенных канальцев 31 пациента с азооспермией и тяжелыми формами олиготератозооспермии с нормальным мужским кариотипом (46, XY), у которых не было обнаружено ни микроделетий Y-хромосомы, ни структурных нарушений хромосом. В 1-ю группу включены 18 пациентов с сохраненным сперматогенезом, включившим дифференцировку герминальных клеток до зрелых сперматид; во 2-ю группу вошли 13 пациентов, у которых выявлены либо клетки Сертоли и сперматогонии, либо только клетки Сертоли.

**Результаты.** Описаны 6 основных типов ультраструктурных нарушений БМ. Наиболее выраженными были инвагинации БМ в виде «переплетений», которые обнаружены у 8 из 13 пациентов 2-й группы. В 1-й группе выявлены единичные «переплетения» у 2 из 18 пациентов. Проведено иммуноцитохимическое исследование распластанных ядер сперматоцитов I порядка у 14 пациентов. У пациентов 2-й группы сперматоциты обнаружить не удалось. У 10 пациентов 1-й группы выявлен «арест» мейоза на стадиях зиготены и пахитены в 18–50 % сперматоцитов. У 6 пациентов выявлено от 30 до 50 % сперматоцитов с нарушением формирования структуры полового тельца.

**Заключение.** Морфологические изменения БМ семенных канальцев («переплетения» и дубликации БМ) сопряжены с выраженными нарушениями мейоза и сперматогенеза. Высказывается предположение о возможности мутаций генов, кодирующих белки БМ.

**Ключевые слова:** сперматогенез, азооспермия, базальная мембрана, мейоз, сперматогенез, синаптомембранный комплекс

**Для цитирования:** Брагина Е.Е., Витязева И.И., Лелекова М.А. и др. Мейоз, сперматогенез и ультраструктура базальной мембраны семенных канальцев у пациентов с азооспермией. Андрология и генитальная хирургия 2019;20(1):43–54.

DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-1-43-54

### Meiosis, spermatogenesis and ultrastructure of the basement membrane of seminiferous tubules in patients with azoospermia

E. E. Bragina<sup>1,2</sup>, I. I. Vityazeva<sup>3</sup>, M. A. Lelekova<sup>4</sup>, A. A. Kashintsova<sup>4</sup>, S. V. Bogolyubov<sup>3</sup>, M. Yu. Gabliya<sup>5</sup>,  
I. V. Vinogradov<sup>5</sup>, V. E. Spanberg<sup>4</sup>, O. L. Kolomiets<sup>4</sup>

<sup>1</sup>A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University; Bld. 40, 1 Leninskie Gory, Moscow 119992, Russia;

<sup>2</sup>Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115522, Russia;

<sup>3</sup>National Medical Research Center of Endocrinology, Ministry of Health of Russia; 11 Dmitriya Ul'yanova St., Moscow 117036, Russia;

<sup>4</sup>N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences; 3 Gubkina St., GSP-1, Moscow 119991, Russia;

<sup>5</sup>RUDN University; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

**The study objective** is to determine the connection between meiosis abnormalities and changes in the basement membrane (BM) ultrastructure of the seminiferous tubules in patients with spermatogenesis disorders: azoospermia or severe oligospermia.

**Materials and methods.** Electron microscopy of BM structure of the seminiferous tubules of 31 patients with azoospermia or severe oligospermia and normal male karyotype (46, XY) without microdeletions of the Y chromosome or structural changes in chromosomes was performed. The group 1 included 18 patients with preserved spermatogenesis including germinal cell differentiation into mature spermatids; the group 2 consisted of 13 patients with either Sertoli cells and spermatogonia or only Sertoli cells.

**Results.** Six main types of ultrastructural changes in BM were observed. The most prominent were BM invaginations in the form of basket weaves that were observed in 8 of 13 patients in the group 2. In the group 1, individual basket weaves were observed in 2 of 18 patients. Immunocytochemical examination of I order spermatocyte spread nuclei in 14 patients was performed. In patients of the group 2, spermatocytes weren't discovered. In 10 patients of the group 1, meiosis arrest at the zygotene and pachytene stages was observed in 18–50 % of spermatocytes. In 6 patients, 30 to 50 % of spermatocytes with impaired formation of the structure of the sex body were revealed.

**Conclusion.** The morphological changes of the BM of the seminiferous tubules ("basket weaves" and duplications of the BM) are associated with marked disorders of meiosis and spermatogenesis. It is suggested about the possibility of mutations of the genes encoding the proteins of BM.

**Key words:** spermatogenesis, azoospermia, basement membrane, meiosis, spermatogenesis, synaptonemal complex

**For citation:** Bragina E.E., Vityazeva I.I., Lelekova M.A. et al. Meiosis, spermatogenesis and ultrastructure of the basement membrane of seminiferous tubules in patients with azoospermia. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2019;20(1):43–54.

## Введение

Базальная мембрана (БМ) играет ключевую роль в процессах развития клеток и физиологических процессах, определяющих их органную организацию, обеспечивающих их адгезию и миграцию. БМ, окружающая семенные канальцы, непосредственно контактирует с клетками Сертоли и сперматогониями. В норме она представляет собой не клеточную пластину толщиной около 0,15 мкм, состоящую из большого количества белков внеклеточного матрикса, в основном из коллагена IV типа, ламинина, протеогликанов гепарансульфата и энтактина [1].

На модельных системах *in vitro* показано, что дифференцировка клеток Сертоли, их морфология и поведение во многом зависят от субстрата, на котором их культивировали [2]. Полноценная дифференцировка клеток Сертоли осуществляется при росте на коллагеновом матриксе, создающем структуру, аналогичную БМ [3]. Тестикулярная БМ служит основой для передачи сигнала трансмембранными рецепторами. В клетках Сертоли, выращенных на матрикеле (искусственной БМ) или ламинине, фолликулостимулирующий гормон индуцирует активность циклического аденозинмонофосфата [4] и изменяет внутриклеточный уровень  $Ca^{2+}$ , необходимых для индукции сперматогенеза [5]. Обработка антителами к белкам БМ семенных канальцев [6] или неколлагеновой фракции БМ [7] вызывает локальные разрушения эпителия семенных канальцев у крыс. Пассивная иммунизация морских свинок антителами к ламинину БМ вызывает нарушение сперматогенеза, в том числе потерю герминативных клеток эпителия [8]. Обработка культивируемых клеток Сертоли, между которыми существуют плотные контакты, антителами к коллагену IV типа разрушает эти плотные контакты [9], что еще раз доказывает важность БМ для осуществления клетками Сертоли барьерной функции.

Процесс сперматогенеза осуществляется строго последовательно и регулируется совместным действием БМ семенных канальцев, гематотестикулярного барьера (ГТБ), специализированными контактами клеток Сертоли и развивающихся сперматид [10]. ГТБ ограничивает базальный и адлюминальный компартменты семенных канальцев. Прелептотенные сперматоциты проходят через ГТБ, формируя плотные и специализированные контакты с клетками Сертоли. Соответственно, весь дальнейший процесс спермиогенеза определяется функцией ГТБ.

Имеются многочисленные данные о нарушении структуры БМ семенных канальцев у человека и животных при патологических состояниях. Аномальная структура, утолщение БМ, отложение иммунных комплексов, десквамация были описаны при исследовании БМ семенных канальцев инфертильных мужчин с нарушениями сперматогенеза. Утолщение БМ наблюдалось при крипторхизме [11, 12], при варикоцеле [13], синдроме Клайнфельтера [14] и олигоастенотератозоспермии [15], а также после вазэктомии [16].

Сложный процесс сперматогенеза состоит из нескольких этапов:

1. Митотические деления и развитие сперматогониев.
2. Два следующих друг за другом мейотических деления сперматоцитов.
3. Дифференцировка гаплоидных сперматид до зрелых сперматозоидов (спермиогенез).
4. Выход зрелых сперматозоидов в просвет семенного канальца (спермиация).

Особое место в процессе сперматогенеза занимает самая длительная фаза мейоза — профазы I, которая состоит из нескольких стадий (лептотены, зиготены, пахитены, диплотены, диакинеза). В профазе I мейоза происходят ключевые события сперматогенеза: формирование и репарация запрограммированных двуниевых разрывов ДНК (double strand breaks), синапсис



гомологов, мейотическая рекомбинация и десинапсис гомологичных хромосом. Нормальное развитие перечисленных событий обеспечивает формирование из диплоидных сперматоцитов гаплоидных сперматозоидов [17]. Синапсис, кроссинговер и десинапсис гомологичных хромосом протекают с участием уникальной структуры мейотического ядра — синаптонемного комплекса (СК). На стадии лептотены вдоль каждой хромосомы формируются осевые элементы, далее в течение зиготены осевые элементы гомологов сближаются, синаптируют и между ними формируется центральный элемент. Таким образом завершается формирование СК [17].

Поведение боковых элементов СК отражает поведение хромосом в мейозе и позволяет выявлять гетероморфные участки хромосом у гетерозигот по хромосомным транслокациям. Антитела к белку RAD51 используют для выявления нарушений репарации запрограммированных двунитевых разрывов ДНК в профазе I мейоза, а антитела к белку мисматч-репарации MLH1 используют для выявления сайтов рекомбинации, которые маркируют участки будущих хиазм. Известно, что нарушение их формирования несет риск анеуплоидии половых клеток и потомства [17].

Характерная черта мужского мейоза — формирование структуры транскрипционно инактивированного «полового тельца», образованного гетероморфными половыми хромосомами. В норме XY-бивалент постепенно выселяется на периферию ядра, что предохраняет частично асинаптированные участки гетероморфных X- и Y-хромосом от негомологичного синапсиса с соматическими хромосомами. Нарушение формирования структуры «полового тельца» служит характерным признаком «ареста» мейоза на стадии пахитены. «Арест» мейоза может происходить на всех стадиях профазы I.

**Цель исследования** — выявить взаимосвязь аномалий мейоза и изменений структуры БМ семенных канальцев у пациентов при выраженном нарушении сперматогенеза — азооспермии или тяжелой форме олигозооспермии.

### Материалы и методы

Стандартное спермиологическое исследование в соответствии с рекомендациями ВОЗ [18], стандартное цитогенетическое исследование (анализ кариотипа культивированных лимфоцитов периферической крови, GTG-окрашивание) и молекулярно-генетическое исследование на наличие частых генетических факторов мужского бесплодия (микроделеции Y-хромосомы в локусе AZF и мутации гена *CFTR*) проведено в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр».

Биоптаты яичек от мужчин с бесплодием получали методом экстракции сперматозоидов из яичка с использованием микрохирургической техники (microsur-

gical testicular sperm extraction) на клинических базах ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России. Использовали материал, оставшийся после извлечения из канальцев тестикулярных сперматозоидов (для их дальнейшей интрацитоплазматической инъекции в процедуре экстракорпорального оплодотворения).

Исследовали биоптаты 31 мужчины с нормальным генотипом XY, у которых не было выявлено микроделеций Y-хромосомы. Эти мужчины имели различные формы азооспермии и тяжелой олигозооспермии и разные андрологические заболевания в анамнезе:

- 10 пациентов — гипергонадотропный гипогонадизм (из них пациент № 11 — паховую ретенцию правого яичка, пациент № 6 — крипторхизм, пациент № 15 — гипоплазию яичек);
- 6 пациентов — гипогонадотропный гипогонадизм (из них пациенты № 2 и 14 — мутацию гена *CFTR*, пациент № 13 — варикоцеле, пациент № 9 — хронический орхит и эпидидимит);
- 10 пациентов — нормогонадотропный гипогонадизм (из них пациент № 12 — крипторхизм, пациент № 3 — варикоцеле, пациенты № 7 и 8 — obstructивную азооспермию, пациенты № 10 и 18 — хламидиоз);
- у 5 пациентов гормональный статус установить не удалось (из них у пациента № 22 в анамнезе варикоцеле, у пациента № 20 — болезнь Ходжкина, у пациента № 21 — орхит в анамнезе).

От каждого пациента получено информированное согласие на проведение цитогенетического исследования клеток яичка.

Электронно-микроскопический анализ биоптатов осуществляли по описанной ранее методике [19, 20]. Исследовали ультраструктуру тестикулярной ткани 31 пациента. В каждом образце при электронно-микроскопическом исследовании рассматривали не менее 2 семенных канальцев.

Иммуноцитохимический анализ структуры синаптонемных комплексов (СК) в распластанных ядрах сперматоцитов выполняли по описанной ранее методике [21] в 13 биоптатах тестикулярной ткани (4 пациентов с гипергонадотропным, 3 пациентов с гипогонадотропным, 3 пациентов с нормогонадотропным гипогонадизмом и 4 пациентов с неустановленным гормональным статусом).

Иммуноцитохимический анализ распластанных ядер сперматоцитов проводили в лаборатории цитогенетики ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, электронно-микроскопическое исследование — в отделе электронной микроскопии НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова». На выполнение исследований

получено разрешение этических комитетов ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН и ФГБНУ «Медико-генетический научный центр».

### Результаты

#### Электронно-микроскопическое исследование.

По клеточному составу образцы были разделены на 2 группы.

В 1-ю группу включены 18 образцов, в семенных канальцах которых были выявлены признаки сохранения спермиогенеза. В стенке семенных канальцев 16 образцов обнаружено формирование зрелых сперматид; в 1 образце – созревание сперматогенных клеток до стадии удлинённых сперматид, ещё в 1 образце – созревание округлых сперматид до стадии «шапочки» (табл. 1).

Во 2-ю группу вошли 13 образцов, в которых сперматиды не выявлены. Сперматогонии и клетки Сертоли обнаружены в 10 образцах, только клетки Сертоли и клеточный детрит – в 3 образцах (табл. 2).

Наиболее выраженным изменением БМ в 1-й группе (см. табл. 1) было диффузное утолщение БМ (в 9 из 18 образцов) (рис. 1а). В 11 из 18 образцов наблюдалась многослойная БМ (от 2 до 8 слоев) с плотно лежащими параллельными слоями нормальной толщины (рис. 1б); отложения гранулярного материала между слоями выявлено в 8 из 18 образцов. В 2 случаях помимо диффузного утолщения и расслоения БМ обнаружены единичные клубочковидные инвагинации БМ в клеточный слой – «переплетения», в англоязычной литературе обозначаемые термином *basket weaves* [22] (рис. 1в).

Во 2-й группе изменения БМ были более выраженными (см. табл. 2). Хорошо заметные многочисленные инвагинации и «переплетения» БМ обнаружены в 8 из 13 образцов (рис. 1г), многослойная БМ – в 8. Гранулярные отложения между слоями БМ – в 9 из 13 образцов, диффузное утолщение БМ – в 6 образцах.

**Иммуноцитохимический анализ структуры синаптонемных комплексов.** Сперматциты I порядка были получены из биоптатов 10 пациентов 1-й группы. Пахитенные сперматциты с полным синапсисом аутосом и сформированным «половым тельцем» (рис. 2а) встречались в единичных случаях.

В 6 образцах обнаружено от 30 до 50 % сперматозоидов с нарушением формирования структуры «полового тельца» (рис. 2б, в) (образцы № 7, 9, 10, 18), что является признаком пахитенного ареста. При этом арест мейоза был связан с нарушением синапсиса хромосом (рис. 2г) или, как в образцах № 12 и 13, с нарушением архитектоники ядер (рис. 2в) и фрагментацией СК (рис. 2д).

В 2 образцах наблюдался арест мейоза на стадии лептотены (образец № 6) и зиготены (№ 11), в 2 – тотальная фрагментация СК (№ 8, 14), в 2 – формирова-

ние кольцевых СК-бивалентов (рис. 2б) (№ 10, 12). Блок мейоза в большинстве сперматозоидов не исключал формирования единичных зрелых сперматид. В некоторых ядрах отмечено отсутствие фокусов белка MLH1 в структуре единичных СК, в том числе полового бивалента (рис. 2б).

Из 5 биоптатов, взятых у пациентов 2-й группы, сперматозоиды для исследования получить не удалось, что соответствовало морфологическим данным: на ультратонких срезах обнаружены клетки Сертоли и сперматогонии, но не сперматозоиды.

### Обсуждение

Исследование биоптатов пациентов с азооспермией или выраженной олигозооспермией продемонстрировало, что тяжесть нарушений сперматогенеза связана со особенностями структуры БМ семенных канальцев.

Мы наблюдали несколько типов нарушений структуры БМ семенных канальцев. В биоптатах почти всех пациентов с андрологическим анамнезом БМ была диффузно утолщенной, часто многослойной. У пациентов 1-й группы, в семенных канальцах которых обнаруживали сперматиды разной стадии зрелости, только в 2 случаях БМ образовала единичные инвагинации.

При исследовании тотальных препаратов СК, полученных из пахитенных сперматозоидов пациентов 1-й группы, нарушения в структуре и поведении СК выявлены в 30–50 % сперматозоидов. Наиболее часто наблюдались признаки «ареста» мейоза на стадии пахитены. Обнаружение фрагментов СК у некоторых пациентов позволяет предположить ломкость хромосом. Это подтверждает и формирование кольцевых хромосом, что связано с потерей прителомерных фрагментов уже завершивших синапсис гомологов. Известно, что формирование кольцевых хромосом приводит к потере связи хромосом с ядерной оболочкой, нарушению архитектоники ядер. Неправильное расхождение кольцевых хромосом на стадии метафазы I мейоза может приводить к формированию анеуплоидных сперматозоидов. Известны случаи выявления кольцевых хромосом в кариотипах пациентов с нарушением фертильности и случаи рождения детей с нарушением развития отцов – носителей кольцевых хромосом [23, 24]. Однако у пациентов этой группы обнаруживались также ядра со сформированным «половым тельцем» и ядра на стадии диплотены, а при электронно-микроскопическом исследовании и при экстракции сперматозоидов из яичка с использованием микрохирургической техники найдены единичные вытянутые сперматиды.

У пациентов с тяжелыми нарушениями сперматогенеза, при которых в стенке семенного канальца имеются только клетки Сертоли или клетки Сертоли и сперматогонии, в структуре БМ обнаружены множественные инвагинации БМ («переплетения»).

**Таблица 1.** Особенности базальной мембраны семенных канальцев, выявленные в биоптатах мужчин 1-й группы (n = 18) с различными формами азоо- и тяжелой олигоспермии и разнообразным андрологическим анамнезом без микроделеций Y-хромосомы

**Table 1.** Features of basement membrane of the seminiferous tubules observed in males of the group 1 with different forms of azoо- and severe oligospermia and various andrological history without microdeletions of the Ychromosome

№ образца Sample No.	Клеточный состав стенок семенных канальцев Cell contents of the seminiferous tubules	Многослойность* Multilayer*	Наличие «переплетений»** Presence of basket weaves**	Отложение гранулярного материала между слоями Accumulation of granular material between the layers	Складчатость Corrugation	Диффузное утолщение Diffuse thickening	Расслоение Separation	Нарушение мейоза Meiosis disorder
1	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation	+ (4-6)	+	+	++	+	+	Не исследовали Wasn't studied
2	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation			+	++	+		Не исследовали Wasn't studied
3	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation	+ (2-4)		+	+		+	Не исследовали Wasn't studied
4	До стадии округлых сперматид Up to round spermatids	+ (2)					+	Не исследовали Wasn't studied
5	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation	+ (2)						Не исследовали Wasn't studied
6	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation	+ (2-6)					+	«Арест» на стадии лептотены и зиготены Arrest at leptotene and zygotene stages
7	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation					+		Пахитенный «арест», фрагментация СК Pachytene arrest, SC fragmentation
8	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation					+		Фрагментация СК, петли СК SC fragmentation, SC loops
9	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation	+ (2-3)		+	++		+	Пахитенный «арест», нарушение архитектоники ядер, разрывы СК Pachytene arrest, nuclear architectonics abnormalities, SC breaks
10	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation	+ (2-8)		+				Пахитенный «арест», фрагментация СК, нарушение архитектоники ядер, кольцевые СК Pachytene arrest, SC fragmentation, nuclear architectonics abnormalities, circular SCs


 Окончание табл. 1  
 The end of the table 1

№ образца Sample No.	Клеточный состав стенок семенных канальцев Cell contents of the seminiferous tubules	Многослойность* Multilayer*	Наличие «переплетений»** Presence of basket weaves**	Отложение гранулярного материала между слоями Accumulation of granular material between the layers	Складчатость Contiguation	Диффузное утолщение Diffuse thickening	Расщепление Separation	Нарушение мейоза Meiosis disorder
11	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation					+		«Арест» на стадии зиготены Arrest at zygotene
12	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation	+ (5–8)				++		Пахитенный «арест», фрагментация СК, нарушение архитектоники ядер, кольцевые СК Pachytene arrest, SC fragmentation, nuclear architectonics abnormalities, circular SCs
13	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation							Пахитенный «арест», нарушение архитектоники ядер, разрывы СК Pachytene arrest, nuclear architectonics abnormalities, SC-breaks
14	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation						+	Фрагментация СК SC fragmentation
15	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation	+ (1–2)					+	Не исследовали Wasn't studied
16	До стадии удлинённых сперматид Up to elongated spermatids	+ (2–4)		+				Не исследовали Wasn't studied
17	До стадии округлых сперматид Up to round spermatids	+ (1–3)		+		+		Не исследовали Wasn't studied
18	Все стадии созревания сперматид All stages of spermatid maturation		++			+	+	Пахитенный «арест» Pachytene arrest
Всего In total		11	2	8	4	9	8	–

\*В скобках указано количество слоев.

\*\*Количество «переплетений» на 5 мкм длины базальной мембраны составляет 1–2.

Примечание. СК – синаптомембранный комплекс.

\*The number of layers is shown in brackets.

\*\*Number of basket weaves per 5 μm of basement membrane length is 1–2.

Note. SC stands for synaptonemal complex.

**Таблица 2.** Особенности базальной мембраны семенных канальцев, выявленные в биоптатах мужчин 2-й группы ( $n = 13$ ) с различными формами азоо- и тяжелой олигозооспермии и разнообразным андрологическим анамнезом без микроделеций Y-хромосомы

**Table 2.** Features of basement membrane of the seminiferous tubules observed in males of the group 2 with different forms of azoospermia and severe oligospermia and various andrological history without microdeletions of the Y chromosome

№ образца Sample No.	Клеточный состав стенок семенных канальцев Cell contents of the seminiferous tubules	Многослойность* Multilayer*	Наличие «переплетений»** Presence of basket weaves**	Отложение гранулярного материала между слоями Accumulation of granular material between the layers	Складчатость Corrugation	Диффузное утолщение Diffuse thickening	Расслоение Separation
19	Клетки Сертоли, гонии Sertoli cells, gonia	+ (1–3)			+	+	
20	Клетки Сертоли, гонии Sertoli cells, gonia					+	+
21	Клетки Сертоли, гонии Sertoli cells, gonia	+ (1–3)		+		+	+
22	Клетки Сертоли, гонии Sertoli cells, gonia		++++	+			
23	Клетки Сертоли, гонии Sertoli cells, gonia	+ (2–4)	++++	+	+		
24	Клетки Сертоли, гонии Sertoli cells, gonia			+		+	+
25	Клетки Сертоли, гонии Sertoli cells, gonia	+ (4–8)	++++	+			
26	Клетки Сертоли, гонии Sertoli cells, gonia	+ (4–6)	++++	+			
27	Клетки Сертоли, гонии Sertoli cells, gonia	+ (4)	++++				
28	Клетки Сертоли Sertoli cells			+		+	
29	Клетки Сертоли Sertoli cells	+ (2–3)	++	+	+	+	
30	Клетки Сертоли, гонии Sertoli cells, gonia	+ (3–5)	++++	+			
31	Клетки Сертоли, гонии Sertoli cells, gonia		++++				+
Всего In total		8	8	9	3	6	4

\*В скобках указано количество слоев.

\*\*Количество «переплетений» на 5 мкм длины базальной мембраны составляет >4.

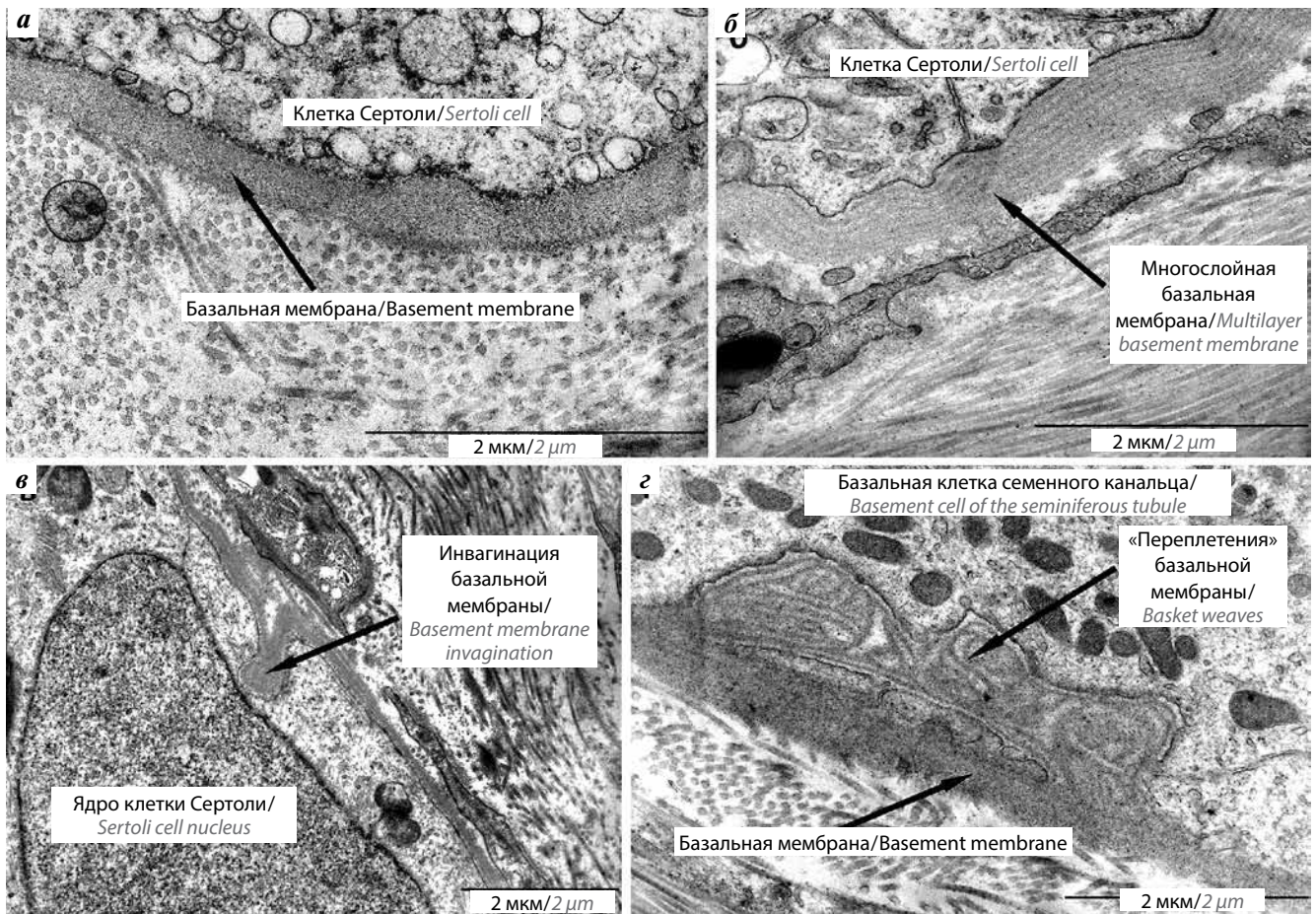
\*The number of layers is shown in brackets.

\*\*Number of basket weaves per 5 μm of basement membrane length is 1–2.

У пациентов 2-й группы в единичных сперматоци-тах выявлены СК без фокусов белка MLH1. Известно, что отсутствие сигналов белка MLH1 в структуре СК связано с нарушениями хиазообразования и несет риск анеуплоидии гамет и плода [21].

Эти случаи представляют особый интерес, так как такие изменения БМ морфологически идентичны изменениям БМ почечных канальцев пациентов [25] и экспериментальных животных [26, 27] с синдромом Альпорта. Синдром Альпорта – заболевание, приво-

дящее к хронической почечной недостаточности с микрогематурией и протеинурией. При нем нарушается синтез коллагена сосудистой стенки в почках, в области внутреннего уха (кортиевоом органе), капсуле хрусталика. При электронно-микроскопическом исследовании ультраструктуры почечных канальцев пациентов с синдромом Альпорта выявляются многослойные БМ, расщепление и диффузное утолщение БМ [28], а также специфические инвагинации БМ – «переплетения» (basket weaves), которые присутствуют



**Рис. 1.** Электронно-микроскопическое исследование. Ультраструктурные особенности базальных мембран (БМ) семенных канальцев: а – утолщенная БМ; б – дупликация БМ; в – единичные инвагинации БМ в цитоплазму клетки Сертоли; г – инвагинации БМ в цитоплазму клеток семенного канальца – «переплетения»

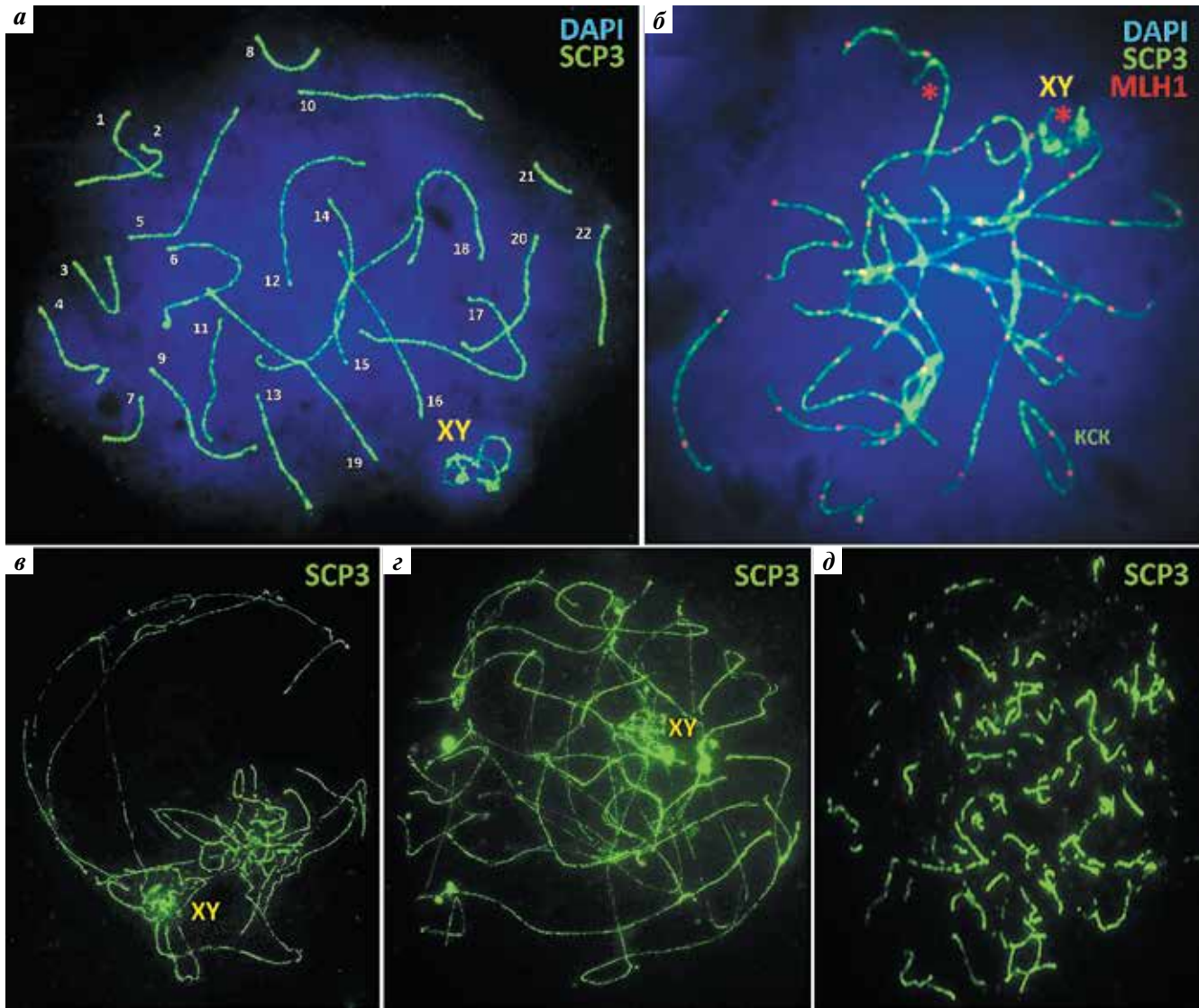
**Fig. 1.** Electron-microscopic study. Ultrastructural changes in the basement membrane (BM) of the seminiferous tubules: а – thickened BM; б – BM duplication; в – individual BM invaginations into Sertoli cell cytoplasm; г – BM invaginations into cytoplasm of seminiferous tubules cells – basket weaves

у большинства пациентов [22] и у экспериментальных животных [29].

В настоящее время известно, что синдром Альпорта – заболевание, обусловленное мутацией генов, локализованных в длинном плече X-хромосомы и кодирующих основной белок БМ – коллаген IV типа [30]. Коллаген IV типа состоит из 6 изоформ –  $\alpha$ -цепей, каждая из которых кодируется отдельным геном (от *COL4A1* до *COL4A6*). Цепи коллагена IV типа, как и цепи других типов коллагена, состоят из триплетов аминокислот (3-я аминокислота – всегда глицин, 2-я – пролин или лизин, а 1-я – любая, кроме указанных). Триплеты обеспечивают переплетение 3  $\alpha$ -цепей в спираль. В отличие от фибриллярного коллагена, образующего жесткие структуры, в сетобразующем коллагене IV многочисленные повторы триплетов перемежаются с другими коллагеновыми доменами. Считается, что эти последовательности обуславливают гибкость БМ. Кроме того, каждая цепь имеет характерные неколлагеновые домены на концах  $\text{NH}_2$ - и  $-\text{COOH}$  [31].

Сеть коллагена IV типа построена из гетеродимеров (протомеров), каждый из которых состоит из 3 изомеров коллагена:  $\alpha 1\alpha 2\alpha 1$ ,  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  и  $\alpha 5\alpha 6\alpha 5$ . БМ всех органов содержит  $\alpha 1\alpha 2\alpha 1$ , в то время как  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  и  $\alpha 5\alpha 6\alpha 5$  синтезируются тканеспецифическим образом [32]. В БМ почечных канальцев человека, мыши и быка присутствует  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  [33], причем изомер коллагена IV типа  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  при нормальном развитии экспрессируется позже, чем  $\alpha 1\alpha 2\alpha 1$ . Аналогичные данные получены при анализе структуры коллагена IV типа БМ семенных канальцев мыши [34], крысы [35] и человека [36]. Считается, что изомер  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  менее чувствителен к протеолитической деградации, чем изомер  $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ , что, возможно, играет главенствующую роль в поддержании структурной целостности БМ почки [37]. У человека синдром Альпорта развивается в результате мутаций в любом из 3 генов коллагена IV типа (*COL4A3*, *COL4A4* или *COL4A5*) и потери 1 из цепей коллагена IV типа ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  или  $\alpha 5$ ) [38]. Поскольку 3 коллагеновые цепи образуют гетеротримеры, в БМ отсутствуют все 3 белка.





**Рис. 2.** Иммуноцитохимическое исследование распластанных ядер сперматоцитов I порядка, полученных из биоптатов яичка пациентов I-й группы: а – в распластанном ядре сперматоцита видны 22 аутомсомных синаптонемных комплекса (СК) и выселенный на периферию ядра половой (XY) бивалент, формирующий так называемое половое тельце; СК маркированы антителами к белку SCP3 (зеленый); б – кольцевой СК-бивалент (КСК). Красными звездочками отмечены аутомсомный и половой (XY) СК-биваленты, в структуре которых отсутствуют сигналы белка мисматч-репарации MLH1 (красный). Хроматин окрашен красителем DAPI (синий); в – нарушение архитектуры ядра; з – нарушение формирования структуры «полового тельца». Половой бивалент (XY) ассоциирует с аутосомами; д – тотальная фрагментация СК в ядре сперматоцита (мейотическая катастрофа)

**Fig. 2.** Immunocytochemical study of spreading nuclei of primary spermatocytes obtained from testicular biopsies of group I patients: а – 22 autosomal synaptonemal complexes (SC) and the sex (XY) bivalent evicted to the periphery of the nucleus, formed so-called sex body, are visible on the periphery of the spreading spermatocyte nucleus. SCs are immunostained with antibodies to SCP3 protein (green). Chromatin stained with DAPI (blue); б – the ring of SC bivalent (KCK) (green). Autosomal and sex SC bivalents, in the structure of which there are no signals of the mismatch repair protein MLH1 (red), are marked with red asterisks; SCs are immunostained with antibodies to SCP3 protein (green). Chromatin stained with DAPI (blue); в – violation of the architectonics of the nucleus; з – violation of the formation of the sex body structure. Sex (XY) bivalent is associated with autosomes; д – total SC fragmentation (green) in the nucleus of spermatocyte (meiotic catastrophe)

Расщепление и многослойность БМ считается отражением внутренних структурных дефектов благодаря тому, что компенсаторная сеть изомера коллагена IV типа  $\alpha 1\alpha 2\alpha 1$  имеет меньше поперечных сшивок и более чувствительна к протеазам [28]. С другой стороны, БМ может просто содержать меньшее количество коллагена IV типа.

При моделировании синдрома Альпорта на животных с нарушениями синтеза коллагена IV не выявлено подобных изменений БМ семенных канальцев, хотя сперматогенез изменяется [36]. Считается, что семенники не подвергаются патологическим изменениям, но при изучении синтеза коллагена IV типа было показано, что значительно уменьшается экспрессия  $\alpha 5$ -цепи [36, 39].

Аномальная структура БМ семенных канальцев, аналогичная таковой при поражении почек, была описана у пациентов с идиопатическим бесплодием в 1982 г. [40]. Формирование многослойных БМ семенных канальцев наблюдалось у мышей с крипторхизмом [41], у крыс после радиоактивного облучения [42]. Имеются единичные исследования, по которым можно судить о том, что при варикоцеле и олигоастенотератозооспермии происходит изменение структуры коллагена IV типа тестикулярной БМ. Как и при синдроме Альпорта, иммуноцитохимическими методами выявлено более выраженное отложение  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -цепей коллагена IV типа, коррелирующее с атипией БМ [43].

В экспериментах *in vitro* и на животных доказано наличие функциональной связи между БМ и ГТБ, имеющим важнейшую функцию в сперматогенезе. Недавно было показано, что барьерную функцию ГТБ регулирует пептид NC1, который является производным коллагена IV типа БМ семенных канальцев [44]. Аномалии структуры БМ и ее составляющих, в частности коллагена IV типа, могут играть первостепенную роль в нарушениях сперматогенеза, нарушая прохождение сперматозитов через ГТБ на ранних этапах мейоза.

### Заключение

Можно предположить, что при азооспермии наряду с морфологическими изменениями БМ семенных канальцев, которые выражаются в формировании «переплетений» и дубликации слоев БМ, возможно также выявление мутаций генов, кодирующих компоненты БМ, например коллагена IV типа, но отличных от мутаций при синдроме Альпорта.

БМ имеет сложный состав: помимо коллагена IV типа, в него входят ламинины 332 и 511, интегрин  $\alpha\beta 4$  и  $\alpha\beta 1$ , плектин, VPAG1, киндлин 1, нидогены 1 и 2, перлекан, коллагены XIII, VI и XVII типов. Образуемые ими мультимолекулярные комплексы в области БМ связывают между собой эпителиальные клетки и клетки соединительной ткани. Мутации кодирующих их генов нарушают эту связь, что проявляется в различных клинически гетерогенных патологических состояниях. Выявление мутаций, ответственных за нарушение структуры БМ при азооспермии и тяжелой форме олигозооспермии даст в руки клиницистам диагностический тест, по значимости сравнимый с выявлением AZF-мутации Y-хромосомы.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Siu M.K., Cheng C.Y. Extracellular matrix: recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Biol Reprod* 2004;71(2):375–91. DOI: 10.1095/biolreprod.104.028225. PMID: 15115723.
2. Dym M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocr Rev* 1994;15(1):102–15. DOI: 10.1210/edrv-15-1-102. PMID: 8156935.
3. Zhang J., Hatakeyama J., Eto K., Abe S. Reconstruction of a seminiferous tubule-like structure in a 3 dimensional culture system of re-aggregated mouse neonatal testicular cells within a collagen matrix. *Gen Comp Endocrinol* 2014;205:121–32. DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.03.030. PMID: 24717811.
4. Dym M., Lamsam-Casalotti S., Jia M.C. et al. Basement membrane increases G-protein levels and follicle-stimulating hormone responsiveness of Sertoli cell adenylyl cyclase activity. *Endocrinology* 1991;128(2):1167–76. DOI: 10.1210/endo-128-2-1167. PMID: 1846579.
5. Grima J., Wong C.C., Zhu L.J. et al. Testin secreted by Sertoli cells is associated with the cell surface, and its expressions correlates with the Sertoli-germ cell junctions but not the inter-Sertoli tight junction. *J Biol Chem* 1998;273(33):21040–53. PMID: 9694856.
6. Lustig L., Denduchis B., González N.N., Puig R.P. Experimental orchitis induced in rats by passive transfer of an antiserum to seminiferous tubule basement membrane. *Arch Androl* 1978;1(4):333–43. PMID: 367304.
7. Denduchis B., Satz M.L., Szein M.B. et al. Multifocal damage of the testis induced in rats by passive transfer of antibodies prepared against non-collagenous fraction of basement membrane. *J Reprod Immunol* 1985;7(1):59–75. PMID: 3973854.
8. Lustig L., Denduchis B., Ponzio R. et al. Passive immunization with anti-laminin immunoglobulin G modifies the integrity of the seminiferous epithelium and induces arrest of spermatogenesis in the guinea pig. *Biol Reprod* 2000;62(6):1505–14. PMID: 10819750.
9. Siu M.K., Lee W.M., Cheng C.Y. The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor- $\alpha$ , gelatinase B(matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. *Endocrinology* 2003;144(1):371–87. DOI: 10.1210/en.2002-220786. PMID: 12488366.
10. Chen H., Mruk D.D., Lee W.M., Cheng C.Y. Regulation of spermatogenesis by a local functional axis in the testis: role of the basement membrane-derived noncollagenous 1 domain peptide. *FASEB J* 2017;31(8):3587–607. DOI: 10.1096/fj.201700052R. PMID: 28487282.
11. Amat P., Paniagua R., Montero J. Seminiferous tubule degeneration in human cryptorchid testes. *J Androl* 1985;6(1):1–9. PMID: 2857707.
12. Santamaria L., Martinez-Onsurbe P., Paniagua R., Nistal M. Laminin, type IV collagen, and fibronectin in normal and cryptorchid human testes. An immunohistochemical study. *Int J Androl* 1990;13(2):135–46. PMID: 1971616.
13. Santoro G., Romeo C., Impellizzeri P. et al. Ultrastructural and immunohistochemical study of basal lamina of the testis in adolescent varicocele. *Fertil Steril* 2000;73(4):699–705. PMID: 10731528.
14. Martin R., Santamaria L., Nistal M. et al. The peritubular myofibroblasts in the testes from normal men and men with Klinefelter's syndrome. A quantitative, ultrastructural, and immunohistochemical study. *J Pathol* 1992;168(1):59–66. DOI: 10.1002/path.1711680111. PMID: 1453270.
15. Pöllänen P.P., Kallajoki M., Risteli L. et al. Laminin and type IV collagen in the human testis. *Int J Androl* 1985;8(5):337–47. PMID: 3912331.

16. Jarow J.P., Budin R.E., Dym M. et al. Quantitative pathologic changes in the human testis after vasectomy. A controlled study. *N Engl J Med* 1985;313(20):1252–6. DOI: 10.1056/NEJM198511143132003. PMID: 4058505.
17. Zickler D., Kleckner N. Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7(6):pii:a016626. DOI: 10.1101/cshperspect.a016626. PMID: 25986558.
18. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5<sup>th</sup> edn. Geneva, 2010. 287 p. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789_eng.pdf).
19. Брагина Е.Е. Электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов как функциональный тест при спермиологическом обследовании. *Андрология и генитальная хирургия* 2002;3:25–7. [Bragina E.E. Electron microscopic study of sperm as a functional test in sperm examination. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2002;3:25–7. (In Russ.)].
20. Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А., Бочарова Е.Н. и др. Внутриклеточное инфицирование сперматозоидов человека вирусами группы герпеса. *Андрология и генитальная хирургия* 2002;3:81–2. [Bragina E.E., Abdumalikov R.A., Bocharova E.N. et al. Intracellular infection of human spermatozoa by herpesviruses. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2002;3:81–2. (In Russ.)].
21. Коломиец О.Л., Лелекова М.А., Кашинцева А.А. и др. Выявление нарушений мейоза и сперматогенеза методами световой, электронной и флуоресцентной микроскопии. *Андрология и генитальная хирургия* 2018;19(1):24–35. [Kolomiets O.L., Lelekova M.A., Kashintsova A.A. et al. Detection of human meiotic and spermatogenic anomalies using light, electron and fluorescence microscopy. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2018;19(1):24–35. (In Russ.)].
22. Heidet L., Gubler M.C. The renal lesions of Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(6):1210–5. DOI: 10.1681/ASN.2008090984. PMID: 19470679.
23. Zuccarello D., Dallapiccola B., Novelli C., Foresta C. Azoospermia in a man with a constitutional ring 22 chromosome. *Eur J Med Genet* 2010;53(6):389–91. DOI: 10.1016/j.ejmg.2010.07.014. PMID: 20709628.
24. Basinkova A., Giovannucci Uzielli M.L., Scarselli G. et al. Clinical and molecular cytogenetic studies in ring chromosome 5: report of a child with congenital abnormalities. *Eur J Med Genetics* 2012;55(2):112–6.
25. Yoshikawa N., Cameron A.H., White R.H. The glomerular basal lamina in hereditary nephritis. *J Pathol* 1981;135(3):199–209. DOI: 10.1016/j.ejmg.2011.11.005. PMID: 22193390.
26. Miner J.M. Organogenesis of the kidney glomerulus: focus on the glomerular basement membrane. *Organogenesis* 2011;7(2):75–82. DOI: 10.4161/org.7.2.15275. PMID: 21519194.
27. O'Leary C.A., Ghoddusi M., Huxtable C.R. Renal pathology of polycystic kidney disease and concurrent hereditary nephritis in Bull Terriers. *Aust Vet J* 2002;80(6):353–61. PMID: 12153062.
28. Hudson B.G., Tryggvason K., Sundaramoorthy M., Neilson E.G. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 2003;348(25):2543–56. DOI: 10.1056/NEJMra022296. PMID: 12815141.
29. Cosgrove D., Kalluri R., Miner J.H. et al. Choosing a mouse model to study the molecular pathobiology of Alport glomerulonephritis. *Kidney Int* 2007;71(7):615–8. DOI: 10.1038/sj.ki.5002115. PMID: 17290292.
30. Funk S.D., Lin M.H., Miner J.H. Alport syndrome and Pierson syndrome: diseases of the glomerular basement membrane. *Matrix Biol* 2018;71–72:250–61. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.04.008. PMID: 29673759.
31. Khoshnoodi J., Sigmundsson K., Cartiailler J.P. et al. Mechanism of chain selection in the assembly of collagen IV: a prominent role for the alpha2 chain. *J Biol Chem* 2006;281(9):6058–69. DOI: 10.1074/jbc.M506555200. PMID: 16373348.
32. Abrahamson D.R., Hudson B.G., Stroganova L. et al. Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(7):1471–9. DOI: 10.1681/ASN.2008101086. PMID: 19423686.
33. Peissel B., Geng L., Kalluri R. et al. Comparative distribution of the alpha 1(IV), alpha 5(IV), and alpha 6(IV) collagen chains in normal human adult and fetal tissues and in kidneys from X-linked Alport syndrome patients. *J Clin Invest* 1995;96(4):1948–57. DOI: 10.1172/JCI118241. PMID: 7560087.
34. Saito K., Naito I., Seki T. et al. Differential expression of mouse alpha5(IV) and alpha6(IV) collagen genes in epithelial basement membranes. *J Biochem* 2000;128(3):427–34. PMID: 10965041.
35. Fröjdman K., Pelliniemi L.J., Virtanen I. Differential distribution of type IV collagen chains in the developing rat testis and ovary. *Differentiation* 1998;63(3):125–30. DOI: 10.1046/j.1432-0436.1998.6330125.x. PMID: 9697306.
36. Harvey S.J., Perry J., Zheng K. et al. Sequential expression of type IV collagen networks: testis as a model and relevance to spermatogenesis. *Am J Pathol* 2006;168(5):1587–97. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050816. PMID: 16651625.
37. Kalluri R., Shield C.F., Todd P. et al. Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J Clin Invest* 1997;99(10):2470–8. DOI: 10.1172/JCI119431. PMID: 9153291.
38. Hudson B.G., Reeders S.T., Tryggvason K. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* 1993;268(35):26033–6. PMID: 8253711.
39. Zheng K., Perry J., Harvey S.J. et al. Regulation of collagen type IV genes is organ-specific: evidence from a canine model of Alport syndrome. *Kidney Int* 2005;68(5):2121–30. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00668.x. PMID: 16221211.
40. Salomon F., Hedinger C.E. Abnormal basement membrane structures of seminiferous tubules in infertile men. *Lab Invest* 1982;47(6):543–54. PMID: 7144137.
41. Hatier R., Grignon G. Ultrastructural study of the Sertoli cell and the limiting membrane in the seminiferous tubule of the adult cryptorchid rat. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1986;52(4):305–18. PMID: 2883755.
42. Sawada H., Esaki M. Electron microscopic observation of 137Cs-irradiated rat testis: production of basal laminae for germ cells, despite their absence. *J Electron Microscop* (Tokyo) 2003;52(4):391–7. PMID: 14599101.
43. Dobashi M., Fujisawa M., Naito I. et al. Distribution of type IV collagen subtypes in human testes and their association with spermatogenesis. *Fertil Steril* 2003;80 Suppl 2:755–60. PMID: 14505750.
44. Wong E.W., Cheng C.Y. NCI domain of collagen alpha3(IV) derived from the basement membrane regulates Sertoli cell blood-testis barrier dynamics. *Spermatogenesis* 2013;3(2):e25465. DOI: 10.4161/spmg.25465. PMID: 23885308.



#### Вклад авторов

Е.Е. Брагина: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

И.И. Витязева: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа;

М.А. Лелекова: получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи;

А.А. Кашинцова: получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи;

С.В. Боголюбов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа;

М.Ю. Габлия: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

И.В. Виноградов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа;

В.Е. Спангенберг: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи;

О.Л. Коломиец: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи.

Все авторы участвовали в обсуждении полученных результатов и редактировании текста рукописи.

#### Authors' contributions

E.E. Bragina: developing the research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing;

I.I. Vityazeva: developing the research design, obtaining data for analysis;

M.A. Lelekova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme;

A.A. Kashintsova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme;

S.V. Bogolyubov: developing the research design, obtaining data for analysis;

M.Yu. Gabliya: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

I.V. Vinogradov: developing the research design, obtaining data for analysis;

V.E. Spangenberg: developing the research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing.

O.L. Kolomiets: developing the research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing.

All authors participated in the discussion of the results and the text of the manuscript editing.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

Е.Е. Брагина/E.E. Bragina: <https://orcid.org/0000-0002-8422-4962>

И.И. Витязева/I.I. Vityazeva: <https://orcid.org/0000-0002-7916-02-12>

М.А. Лелекова/M.A. Lelekova: <https://orcid.org/0000-0003-1467-253X>

А.А. Кашинцова/A.A. Kashintsova: <https://orcid.org/0000-0001-9715-381X>

С.В. Боголюбов/S.V. Bogolyubov: <https://orcid.org/0000-0003-1974-5005>

М.Ю. Габлия/M.Yu. Gabliya: <https://orcid.org/0000-0002-8176-2597>

И.В. Виноградов/I.V. Vinogradov: <https://orcid.org/0000-0001-7469-3952>

В.Е. Спангенберг/V.E. Spangenberg: <https://orcid.org/0000-0002-6623-9124>

О.Л. Коломиец/O.L. Kolomiets: <https://orcid.org/0000-0002-1915-0039>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке в рамках гранта РФФИ № 16-04-01447 и бюджетного финансирования по договору № 0112-2016-0008, с использованием оборудования ЦКП ОБН РАН «Генетический полиморфизм».

**Financing.** The study was performed with the financial support within the framework of scientific projects № 16-04-01447, and budget financing under the contract № 0112-2016-0008, using equipment of CCU DBS RAS "Genetic polymorphism".

**Информированное согласие.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Informed consent.** All patients gave written informed consent to participate in the study.