

Прогностические возможности протеомного анализа семенной плазмы у мужчин с азооспермией

А.Г. Бржозовский¹, Н.Л. Стародубцева¹, А.Е. Бугрова^{1,2}, А.С. Кононихин¹, В.В. Чаговец¹, Т.В. Шатылко¹, С.И. Гамидов^{1,3}, А.Х. Тамбиев³, А.Ю. Попова¹, Н.Г. Гасанов¹, Т.Б. Бицоев³, В.Е. Франкевич¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России; Россия, 117198 Москва, ул. Академика Опарина, 4;

²ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; Россия, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4;

³ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Алихан Халитович Тамбиев dr.tambiev@gmail.com

Введение. Согласно результатам исследований, семенная плазма является богатым источником биомаркеров при мужском бесплодии, в том числе маркеров остаточного сперматогенеза у мужчин с азооспермией. В большинстве случаев инвазивные процедуры для получения семенной плазмы не требуются. В связи с этим неинвазивный тест для выявления мужчин с азооспермией с остаточным очаговым сперматогенезом может улучшить отбор пациентов для процедуры микродиссекционной тестикулярной экстракции сперматозоидов (microTESE) и стать полезным при консультировании пациентов.

Цель исследования – оценка возможности использования протеомного анализа семенной плазмы для выявления мужчин с азооспермией с остаточным очаговым сперматогенезом в яичках, которые могут иметь более высокие шансы на извлечение сперматозоидов при процедуре microTESE.

Материалы и методы. Исследованы образцы семенной плазмы 36 мужчин в возрасте 21–45 лет (средний возраст $33,3 \pm 3,9$ года) на протеомный состав. Для анализа протеома белки гидролизировали трипсином. Полученные пептиды анализировали с использованием хромато-масс-спектрометрического комплекса, состоящего из жидкостного хроматографа nano-HPLC Agilent 1100 и масс-спектрометра высокого разрешения 7T LTQ-FT Ultra. Данные протеомного анализа были сопоставлены с результатами процедуры microTESE.

Результаты. В данном исследовании оценивался протеомный состав семенной плазмы при азооспермии. Полуквантитативный анализ без меток с использованием подхода «снизу вверх» выявил 405 различных белков, из числа которых 174 белка были обнаружены во всех образцах. Полученные количественные параметры образцов оказались достаточными для выявления больных с очаговым сперматогенезом.

Заключение. Семенная плазма служит потенциальным источником биологических маркеров для прогнозирования успешности извлечения сперматозоидов у пациентов с азооспермией. Это предварительные результаты и необходимы дальнейшие исследования, чтобы подтвердить достоверность полученной панели белков.

Ключевые слова: азооспермия, протеом эякулята, мужское бесплодие, семенная плазма

Для цитирования: Бржозовский А.Г., Стародубцева Н.Л., Бугрова А.Е. и др. Прогностические возможности протеомного анализа семенной плазмы у мужчин с азооспермией. Андрология и генитальная хирургия 2021;22(3):18–24. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-22-3-18-24.

Prognostic capabilities of proteomic analysis of seminal plasma in males with azoospermia

A.G. Brzhozovskiy¹, N.L. Starodubtseva¹, A.E. Bugrova^{1,2}, A.S. Kononihin¹, V.V. Chagovets¹, T.V. Shatylko¹, S.I. Gamidov^{1,3}, A.Kh. Tambiyev³, A.Yu. Popova¹, N.G. Gasanov¹, T.B. Bitsoyev³, V.E. Frankevich¹

¹V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia; 4 Akademika Oparina St., Moscow 117198, Russia;

²N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences; 4 Kosigin St., Moscow 119991, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Contacts: Alikhan Khalitovich Tambiyev dr.tambiev@gmail.com

Introduction. According to research, seminal plasma is a rich source of biomarkers in male infertility including biomarkers of residual spermatogenesis in males with azoospermia. In many cases, extraction of seminal plasma does not require invasive procedures. Therefore, non-invasive test for identification of males with azoospermia and residual focal spermatogenesis can improve selection of patients for microdissection testicular sperm extraction (microTESE) and become a useful tool for patient consultation.

The study objective is to evaluate capabilities of proteomic analysis of seminal plasma for identification of males with azoospermia and residual focal spermatogenesis in the testes who have higher chance for sperm extraction using the microTESE procedure.

Materials and methods. Samples of seminal plasma of 36 males between 21 and 45 years of age (mean age 33.3 ± 3.9 years) were tested for proteomic composition. For proteomic analysis, proteins were hydrolyzed with trypsin. The obtained peptides were analyzed using chromatography-mass spectrometry complex composed of liquid chromatograph nano-HPLC Agilent 1100 and high-resolution mass spectrometer 7T LTQ-FT Ultra. Proteomic analysis data were compared with results of the microTESE procedure.

Results. In this study, proteomic composition of seminal plasma in azoospermia was assessed. Semi-quantitative analysis without markers using bottom-up approach identified 405 different proteins, and 174 of them were detected in all samples. The obtained quantitative parameters were sufficient to identify patients with focal spermatogenesis.

Conclusion. Seminal plasma is a potential source of biological markers for prediction of sperm extraction success in patients with azoospermia. The presented results are preliminary, and further studies are needed to confirm the identified protein panel.

Key words: azoospermia, ejaculate proteome, male infertility, seminal plasma

For citation: Brzhozovskiy A.G., Starodubtseva N.L., Bugrova A.E. et al. Prognostic capabilities of proteomic analysis of seminal plasma in males with azoospermia. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya* = *Andrology and Genital Surgery* 2021;22(3):18–24. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-22-3-18-24.

Введение

Мужское бесплодие обусловлено весьма гетерогенной группой нарушений, которые могут привести к различным изменениям в составе спермы и концентрации сперматозоидов. Азооспермия — это спермиологический синдром, который имеет самые серьезные последствия для репродуктивного прогноза мужчины. Ее определяют как полное отсутствие сперматозоидов в эякуляте [1]. Однако даже у пациентов с необструктивной азооспермией может быть шанс стать биологическим отцом при наличии очагового сперматогенеза в яичках. Может быть предпринята попытка хирургического извлечения сперматозоидов, и, если она окажется успешной, извлеченные сперматозоиды могут быть использованы для интрацитоплазматической инъекции (ICSI) в рамках протокола вспомогательной репродукции [2, 3]. Хирургическое получение образцов ткани яичка, выполняемое под местной или общей анестезией, часто является единственным вариантом получения сперматозоидов для процедуры ICSI. Несмотря на все технические достижения, такие как использование процедур микродиссекционной тестикулярной экстракции сперматозоидов (microTESE), и попытки отбора перспективных пациентов на основе клинических и лабораторных данных, частота успешного извлечения сперматозоидов у пациентов с необструктивной азооспермией остается относительно низкой. Это означает, что некоторые пациенты проходят дорогостоящую инвазивную процедуру без каких-либо гарантий

на успех. Кроме того, иногда бывает трудно идентифицировать пациентов, у которых повторная биопсия яичек может оказаться успешной или которым может быть показана адъювантная фармакологическая стимуляция сперматогенеза, поскольку даже результаты гистологического исследования ткани яичек имеют довольно низкую прогностическую ценность с точки зрения выявления пациентов с очаговым сперматогенезом [4]. Наконец, психологические последствия неудачных попыток хирургической экстракции сперматозоидов могут быть разрушительными в некоторых случаях, поскольку некоторые пары после получения отрицательных результатов биопсии могут считать, что им изначально дали ложную надежду. Таким образом, неинвазивный тест для выявления мужчин с азооспермией с остаточным очаговым сперматогенезом может улучшить отбор пациентов для процедуры microTESE и стать полезным при консультировании пациентов. Эта задача может быть решена с помощью молекулярной биологии. Семенная плазма, по-видимому, является богатым источником биомаркеров мужского бесплодия и, что немаловажно, в большинстве случаев не требует инвазивных процедур для ее получения [5, 6]. Это сложная смесь секретов мужских половых желез, включая предстательную железу и яички.

Цель данного исследования — оценка возможности использования протеомного анализа семенной плазмы для выявления мужчин с азооспермией с остаточным очаговым сперматогенезом в яичках, которые могут

иметь разумные шансы на извлечение сперматозоидов при процедуре microTESE.

Материалы и методы

Образцы семенной плазмы были получены у 36 мужчин в возрасте 21–45 лет ($33,3 \pm 3,9$ года), обследованных и пролеченных по поводу азооспермии в отделении андрологии и урологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России (Москва) в период с января по июнь 2018 г. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании и подписали соответствующую форму.

Критериями включения в исследование были азооспермия (подтвержденная не менее 2 раз с помощью микроскопического анализа) и наличие подписанной пациентом формы информированного согласия на участие в исследовании. Критерии исключения: обострение хронических заболеваний; активная гормональная терапия; инфекции, передающиеся половым путем; декомпенсированные воспалительные состояния, поражающие почки, печень и легкие; анэякуляция; ретроградная эякуляция; лейкоцитоспермия.

Клиническое обследование включало подробный сбор анамнеза пациента, оценку сывороточных гормонов (фолликулостимулирующий, лютеинизирующий гормон, пролактин, тестостерон, эстрадиол, ингибин В), генетическое тестирование (кариотип, AZF, CFTR) и ультразвуковое исследование мошонки. Всем пациентам была проведена процедура microTESE.

Образцы семенной плазмы центрифугировали при 2000g в течение 10 мин при температуре 4 °C для удаления клеточного состава. Супернатанты (надосадочная жидкость) хранили при температуре –80 °C. Для анализа протеома белки восстанавливали, алкилировали и гидролизировали трипсином [7]. Смеси триптических пептидов разделяли на хроматографической системе nano-HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) с использованием капиллярной колонки C18 и анализировали на масс-спектрометре высокого разрешения 7T LTQ-FT Ultra (Thermo Electron, Германия) с источником ионизации на основе наноспрея (положительное высокое напряжение, 2,1 кВ), накопление масс-спектров проводилось в режиме зависимости от данных (DDA). Для полуколичественного анализа без меток хромато-масс-спектрометрические данные обрабатывались с помощью программного обеспечения MaxQuant (версия 1.1.1.2), поиск и идентификация белков и пептидов проводились по базе данных SwissProt.

Для оценки изменений протеомного состава семенной плазмы у больных азооспермией использовали

t-тест Уэлча с поправкой Бонферрони (статистически значимыми считали различия при $p < 0,01$).

Результаты

Все 36 пациентов были включены в окончательный анализ в соответствии с критериями включения и исключения. Данные анамнеза собирали с помощью анкетирования и беседы пациента с врачом. Все пациенты имели азооспермию, но в 18 случаях сперматозоиды были обнаружены при исследовании ткани яичек. Эти пациенты составили референсную группу с сохранным очаговым сперматогенезом.

В данном исследовании оценивался протеомный состав семенной плазмы при азооспермии. Полуколичественный анализ без меток с использованием подхода «снизу вверх» выявил 405 различных белков, из числа которых 174 белка были обнаружены во всех образцах (см. рисунок). Уникальные белки для определенных когорт пациентов были аннотированы с помощью базы данных GeneOntology. Известно, что эти белки участвуют в различных процессах регуляции, таких как отрицательная регуляция каталитической активности, биосинтез малых молекул и гуморальный иммунный ответ.

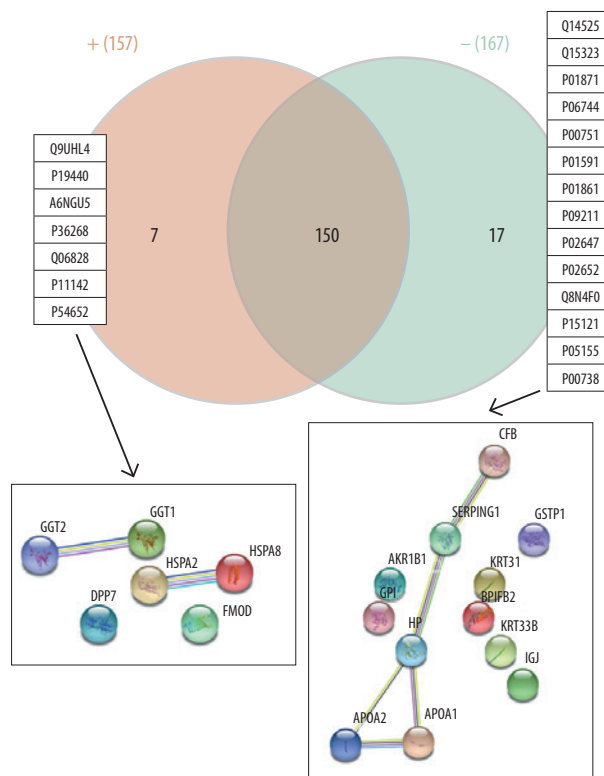


Диаграмма Венна для 174 белков, обнаруженных в протеоме семенной плазмы пациентов исследуемых групп: азооспермия с успешной попыткой хирургического извлечения сперматозоидов (+); азооспермия с отрицательным исходом хирургического извлечения сперматозоидов (–) Venn diagram for 174 proteins detected in seminal plasma proteome of patients of the studied groups: azoospermia with successful attempt of surgical sperm extraction (+); azoospermia with negative result of surgical sperm extraction (–)

В результате оценки изменений протеомного состава семенной плазмы у больных азооспермией с использованием *t*-теста Уэлча с поправкой Бонферрони ($p < 0,01$) было идентифицировано 18 достоверно дифференцированно экспрессируемых белков (см. таблицу). Ранее было показано, что эти белки участвуют в сперматогенезе.

Таким образом, наиболее измененными биологическими процессами в зависимости от наличия или отсутствия остаточного очагового сперматогенеза были реакция иммунной системы (11 белков), заживление ран (8 белков) и гомеостатическая регуляция (5 белков).

Список белков семенной плазмы с дифференциальной экспрессией у пациентов с азооспермией с положительным и отрицательным исходом хирургических попыток извлечения сперматозоидов

List of seminal plasma proteins with differential expression in patients with azoospermia and positive and negative outcomes of surgical sperm extraction

Идентификатор белка Protein identifier	Ген Gene	Белок Protein	<i>p</i>
P25311	<i>AZGP1</i>	Цинк-альфа-2-гликопротеин Zinc-alpha-2-glycoprotein	0,00027
P80723	<i>BASP1</i>	Кислоторастворимый белок 1 мозга Brain acid soluble protein 1	0,0031
P21926	<i>CD9</i>	Антиген CD9 CD9 antigen	0,0065
P01034	<i>CST3</i>	Цистатин С Cystatin C	0,0035
P01036	<i>CST4</i>	Цистатин S Cystatin S	0,0014
P01876	<i>IGHA1</i>	С-область цепи альфа-1 Ig Ig alpha-1 chain C region	0,0013
P01857	<i>IGHG1</i>	С-область цепи гамма-1 Ig Ig gamma-1 chain C region	0,00011
P01859	<i>IGHG2</i>	С-область цепи гамма-2 Ig Ig gamma-2 chain C region	0,0075
P01834	<i>IGKC</i>	С-область цепи каппа Ig Ig kappa chain C region	7,1E-06
P08473	<i>MME</i>	Неприлизин Nepirylisin	0,0011
P80303	<i>NUCB2</i>	Нуклеобиндин-2, несфатин-1 Nucleobindin-2, nesfatin-1	0,00097
P19652	<i>ORM2</i>	Альфа-1-кислый гликопротеин (орозомукоид) Alpha-1-acid glycoprotein 2	1,5E-06
P12273	<i>PIP</i>	Пролактин-индуцированный белок Prolactin-inducible protein	2,0E-07
P07602	<i>PSAP</i>	Просапозин Prosaposin	0,0019
Q02383	<i>SEMG2</i>	Семеногелин 2 Semenogelin 2	0,00025
P20155	<i>SPINK2</i>	Ингибитор сериновой протеазы Казал-типа 2 Serine protease inhibitor Kazal-type 2	0,0026
Q08629	<i>SPOCK1</i>	Тестикан-1 Testican-1	9,7E-05
P02787	<i>TF</i>	Серотрансферрин Serotransferrin	8,8E-07

Целесообразность использования протеомного анализа для дифференцировки образцов семенной плазмы мужчин с положительным и отрицательным исходом *microTESE* оценивалась с помощью контролируемого многофакторного анализа *OPLS-DA* с использованием программного обеспечения *SIMCA*. График оценки показал хорошую кластеризацию точек, соответствующих отдельной группе пациентов с азооспермией (с остаточным сперматогенезом и без него). Количественные параметры модели оказались достаточными для дифференциации пациентов с остаточным сперматогенезом: R^2 составил 0,51, а прогностическая способность модели, оцененная по Q^2 , — 0,31. Эти результаты являются предварительными, и необходимы дальнейшие исследования для подтверждения этой белковой панели.

Обсуждение

Целью нашего исследования было выявление в семенной плазме маркеров очагового сперматогенеза у мужчин с азооспермией. Нам удалось найти несколько белков-кандидатов, которые теперь требуют более масштабных исследований и подтверждения в проспективных исследованиях.

Среди них *BASP*, потенциальная ценность которого вызывает некоторые сомнения, так как исследователям из ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» удалось обнаружить этот белок в постмейотических сперматидях крыс [8]. Если мы предположим, что эти результаты могут быть экстраполированы на человека, то *BASP1* будет иметь ограниченную ценность, поскольку он будет присутствовать в семенной плазме даже у пациентов с остановкой созревания сперматозоидов, в то время как сами сперматиды сегодня обычно не используются во вспомогательной репродукции.

Известно, что пролактин-индуцируемый белок (*PIP*) играет важную роль в регуляции иммунных реакций, апоптоза и прогрессирования опухолей. А.К. Томаг и соавт. установили, что у мужчин с азооспермией значительно снижена концентрация *PIP* в семенной плазме по сравнению с мужчинами с нормоспермией и олигозооспермией [9]. В исследовании W.W. Chiu и L.W. Chamley было продемонстрировано, что *PIP* является одним из белков, способных связывать иммуноглобулины класса G в семенной плазме и тем самым защищать сперматозоиды от аутоиммунных реакций [10]. В комплексе с альбумином *PIP* участвует в регуляции подвижности сперматозоидов [11]. Любопытно, что *PIP* способен образовывать стабильные комплексы с другим белком, идентифицированным в нашем исследовании, — цинк-альфа-2-гликопротеином (*AZGP1*), хотя биологическая роль взаимодействия между этими молекулами пока непонятна [12]. *AZGP1*, как известно, является гликопротеином сперматозоидов, экспрессирующимся в каудальной области придатка яичка и секретлируемым

во внеклеточную среду [13]. В исследовании Y.N. Qi и соавт. была продемонстрирована корреляция между уровнем продукта экспрессии гена *AZGP1*, концентрацией и количеством сперматозоидов в эякуляте, хотя в эту работу не включались пациенты с азооспермией [14].

Цистатин С известен, в первую очередь, как маркер хронической почечной недостаточности, но есть данные о том, что он служит регулятором активности протеазных ферментов, необходимым для успешного прохождения определенных стадий сперматогенеза. G.P. Silva и соавт. обнаружили, что концентрация цистатина С в семенной жидкости пациентов на хроническом гемодиализе существенно снижена при олигозооспермии любой степени выраженности, но эти данные трудно экстраполировать на мужчин с сохранной функцией почек [15]. Та же группа авторов изучила концентрацию альфа-1-кислого гликопротеина (орозомукоида) в семенной плазме пациентов на хроническом гемодиализе, но не выявила никакой связи ни со степенью нарушения почечной функции, ни с показателями спермограммы [16]. В более раннем исследовании D. Panidis и соавт. также не обнаружили корреляции между параметрами спермограммы и содержанием этого белка в семенной плазме [17]. Тем не менее в нашей работе орозомукоид продемонстрировал дифференциальную экспрессию в зависимости от результатов *microTESE*. Возможно, это связано со спецификой исследуемой популяции — у пациентов с obstructивной азооспермией протеомный профиль эякулята так или иначе должен отличаться от остальных групп бесплодных пациентов.

Просапозин — лизосомальный белок, содержащийся в клетках Сертоли, просвете семенных канальцев и канальцев придатка яичка. Есть данные, согласно которым его присутствие в семенной плазме коррелирует с результативностью экстракорпорального оплодотворения [18]. Результаты нашего исследования говорят о том, что это также может свидетельствовать о наличии остаточного сперматогенеза в яичках при obstructивной азооспермии.

Дифференциальная экспрессия семеногелина 2 является несколько неожиданной находкой, так как функция этого белка заключается преимущественно в обеспечении коагуляции спермы. Достоверно неизвестно, участвуют ли каким-либо образом молекулы семеногелинов в регуляции сперматогенеза. В исследовании P.T. Del Giudice и соавт. было зафиксировано увеличение содержания семеногелина 1 и 2 в эякуляте после хирургического лечения варикоцеле у подростков, и этот результат был признан ими случайным [19]. Однако нельзя до конца исключить то, что экспрессия этих белков может быть косвенным маркером активности сперматогенеза.

Интерес представляет наличие *SPINK2* среди наших белков-кандидатов, который был описан как ингибитор протеазы, нацеленный на акрозин, в то время как его отсутствие было связано с азооспермией у мышей [20].

SPINK2 экспрессируется в герминальных клетках [21]. Полное отсутствие герминальных клеток при тотальном сертоли-клеточном синдроме может характеризоваться отсутствием следов этого белка в семенной плазме.

По остальным белкам в доступной форме информации о профиле экспрессии в семенной плазме не найдено. В любом случае потенциальная диагностическая роль, а также молекулярная основа их актуальности еще должны быть выяснены для многих идентифицированных дифференциально экспрессируемых белков.

Это пилотное исследование, и данный факт определяет большинство его неизбежных недостатков. Также стоит отметить, что за неимением лучшей контрольной группы мы принимаем отрицательный результат microTESE за отсутствие остаточного сперматогенеза. Однако отрицательный результат извлечения сперматозоидов, а также неблагоприятные гистологические признаки сами по себе не свидетельствуют об отсутствии сперматогенеза в паренхиме яичек, а указывают

на отсутствие сперматогенеза только в исследуемом образце, который может быть не полностью репрезентативен для всех семенных канальцев. Но с практической точки зрения такое использование отрицательного результата microTESE кажется достаточным для нашего экспериментального исследования, так как в большинстве случаев при азооспермии предпринимается только 1 попытка извлечения сперматозоидов (microTESE) и очень редко — более 2.

Заключение

Семенная плазма служит потенциальным источником биологических маркеров для прогнозирования успешного извлечения сперматозоидов у пациентов с азооспермией. Протеомный профиль семенной плазмы пациентов с остаточным сперматогенезом имеет явные отличия от профиля пациентов с полным отсутствием сперматогенеза. Это предварительные результаты, и необходимы дальнейшие исследования, чтобы подтвердить достоверность полученной панели белков.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wosnitzer M., Goldstein M., Hardy M.P. Review of Azoospermia. *Spermatogenesis* 2014;4:e28218. DOI: 10.4161/spmg.28218.
2. Oates R. Evaluation of the azoospermic male. *Asian J Androl* 2012;14(1):82–7. DOI: 10.1038/aja.2011.60.
3. Гасанов Н.Г., Гамидов С.И., Шатылко Т.В. и др. Роль пункционной биопсии яичка в ведении пациентов с азооспермией. *Исследования и практика в медицине* 2020;7(3):43–50. [Gasanov N.G., Gamidov S.I., Shatylo T.V. et al. Role of percutaneous testis biopsy in management of patients with azoospermia. *Issledovaniya i praktika v meditsine = Research'n Practical Medicine Journal* 2020;7(3):43–50. (In Russ.)]. DOI: 10.17709/2409-2231-2020-7-3-4.
4. Berookhim B.M., Palermo G.D., Zaninovic N. et al. Microdissection testicular sperm extraction in men with Sertoli cell-only testicular histology. *Fertil Steril* 2014;102(5):1282–6. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.08.007.
5. Liu X., Wang W., Zhu P. et al. In-depth quantitative proteome analysis of seminal plasma from men with oligoasthenozoospermia and normozoospermia. *Reprod Biomed Online* 2018;37(4):467–79. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.06.025.
6. Шатылко Т.В., Гамидов С.И., Франкевич В.Е. и др. Астенозооспермия и протеомные факторы регуляции подвижности сперматозоидов. *Акушерство и гинекология* 2020;4:37–44. [Shatylo T.V., Gamidov S.I., Frankevich V.E. et al. Astenozoospermia and proteomic factors regulating sperm motility. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology* 2020;4:37–44. (In Russ.)]. DOI: 10.18565/aig.2020.4.37-44.
7. Starodubtseva N.L., Kononikhin A.S., Bugrova A.E. et al. Investigation of urine proteome of preterm newborns with respiratory pathologies. *J Proteomics* 2016;149:31–7. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.06.012.
8. Mosevitsky M.I., Snigirevskaya E.S., Komissarchik Y.Y. Immunoelectron microscopic study of BASP1 and MARCKS location in the early and late rat spermatids. *Acta Histochem* 2012;114(3):237–43. DOI: 10.1016/j.acthis.2011.06.009.
9. Tomar A.K., Sooch B.S., Singh S., Yadav S. Quantification studies in human seminal plasma samples identify prolactin inducible protein as a plausible marker of azoospermia. *Biomarkers* 2012;17(6):545–51. DOI: 10.3109/1354750X.2012.699555.
10. Chiu W.W., Chamley L.W. Human seminal plasma prolactin-inducible protein is an immunoglobulin G-binding protein. *J Reprod Immunol* 2003;60(2):97–111. DOI: 10.1016/s0165-0378(03)00084-6.
11. Kumar S., Tomar A.K., Singh S. et al. Human serum albumin as a new interacting partner of prolactin inducible protein in human seminal plasma. *Int J Biol Macromol* 2012;50(2):317–22. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.12.015.
12. Hassan M.I., Bilgrami S., Kumar V. et al. Crystal structure of the novel complex formed between zinc alpha2-glycoprotein (ZAG) and prolactin-inducible protein (PIP) from human seminal plasma. *J Mol Biol* 2008;384(3):663–72. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.09.072.
13. Jerczynski O., Lacroix-Pépin N., Boilard E. et al. Role of Dicer1-Dependent Factors in the Paracrine Regulation of Epididymal Gene Expression. *PLoS One* 2016;11(10):e0163876. DOI: 10.1371/journal.pone.0163876.
14. Qi Y.N., Ma J., Han R.Y. et al. [Correlation of seminal plasma zinc alpha-2 glycoprotein with semen quality in obese males (In Chinese)]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2018;24(3):216–20. PMID: 30161306.
15. Silva G.P., Grangeiro V.P.X., de Oliveira C.F.D., Neto F.L. Cystatin C and Seminal Parameter Evaluation in Patients with End-Stage Renal Disease. *Curr Urol* 2020;14(4):178–82. DOI: 10.1159/000499241.
16. Silva G.P., Grangeiro V.P.X., de Oliveira C.F.D. et al. α 1-Acid glycoprotein and seminal parameter in chronic hemodialysis patients. *Urologia* 2021;88(1):46–9. DOI: 10.1177/0391560319899842.
17. Panidis D., Rousso D., Panidou E., Asseo P. Orosomucoid levels in the seminal plasma of fertile and infertile men. *Arch Androl*

- 1993;30(3):161–4.
DOI: 10.3109/01485019308987751.
18. Xu C., Cai J., Liu L., Ren J.
Prosaposin in seminal plasma on the day of oocyte retrieval is associated with normal fertilization and embryo development in *in vitro* fertilization cycles. *PeerJ* 2019;7:e8177.
DOI: 10.7717/peerj.8177.
19. Del Giudice P.T., da Silva B.F., Lo Turco E.G. et al. Changes in the seminal plasma proteome of adolescents before and after varicocele-ctomy. *Fertil Steril* 2013;100(3):667–72.
DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.036.
20. Kherraf Z.-E., Christou-Kent M., Karaouzene T. et al. SPINK2 deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azoospermia in homozygotes. *EMBO Mol Med* 2017;9(8):1132–49. DOI: 10.15252/emmm.201607461.
21. Zhang H.-W., Zhang L., Chen Y.-M. et al. The role of SPAG6/SPINK2 protein complex in the formation of sperm acrosome in mice (In Chinese). *Zhonghua Nan Ke Xue* 2019;25(3):202–8. PMID: 32216237.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке проекта Российского научного фонда (№ 18-75-10097). Хромато-масс-спектрометрический анализ проводился на оборудовании Центра коллективного пользования «Новые материалы и новые технологии» ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН.

Acknowledgment. The work was supported by the project of the Russian Science Foundation (No 18-75-10097). Chromato-mass spectrometric analysis was carried out on the equipment of the Center for Collective Use “New materials and New technologies” of the N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences.

Вклад авторов

А.Г. Бржозовский, А.Е. Бугрова, А.С. Кононихин, В.В. Чаговец: работа с биологическим материалом, техническое редактирование;
Н.Л. Стародубцева: концепция и дизайн исследования, написание текста статьи, работа с биологическим материалом;
Т.В. Шатылко: написание текста статьи, оформление библиографии, выполнение операций, ассистирование на операциях;
С.И. Гамидов: концепция и дизайн исследования, выполнение операций, написание статьи, научное редактирование;
А.Х. Тамбиев: написание текста статьи, оформление библиографии, сбор и интерпретация данных, подготовка статьи;
А.Ю. Попова: выполнение операций, ассистирование на операциях, научное редактирование;
Н.Г. Гасанов: выполнение операций, ассистирование на операциях;
Т.Б. Бицоев: написание текста статьи, оформление библиографии, сбор данных;
В.Е. Франкевич: концепция и дизайн исследования, работа с биологическим материалом, техническое редактирование.

Author's contributions

A.G. Brzhozovskiy, A.E. Bugrova, A.S. Kononihin, V.V. Chagovets: working with biological material, technical editing;
N.L. Starodubtseva: the concept and development of research design, writing the text of the article, working with biological material;
T.V. Shatylko: writing the text of the article, making a bibliography, performing operations, assisting in operations;
S.I. Gamidov: the concept and development of research design, performing operations, scientific editing;
A.Kh. Tambiyev: writing the text of the article, making a bibliography, collecting and interpreting data, preparing the article;
A.Yu. Popova: performing operations, assisting in operations, scientific editing;
N.G. Gasanov: performing operations, assisting on operations;
T.B. Bitsoyev: writing the text of the article, making a bibliography, collecting data;
V.E. Frankevich: the concept and development of research design, working with biological material, technical editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.Г. Бржозовский / A.G. Brzhozovskiy: <https://orcid.org/0000-0003-1128-1795>
Н.Л. Стародубцева / N.L. Starodubtseva: <https://orcid.org/0000-0001-6650-5915>
А.Е. Бугрова / A.E. Bugrova: <https://orcid.org/0000-0003-4568-7507>
А.С. Кононихин / A.S. Kononihin: <https://orcid.org/0000-0002-2238-3458>
В.В. Чаговец / V.V. Chagovets: <https://orcid.org/0000-0002-5120-376X>
Т.В. Шатылко / T.V. Shatylko: <https://orcid.org/0000-0002-3902-9236>
С.И. Гамидов / S.I. Gamidov: <https://orcid.org/0000-0002-9128-2714>
А.Ю. Попова / A.Yu. Popova: <https://orcid.org/0000-0003-1163-5602>
Н.Г. Гасанов / N.G. Gasanov: <https://orcid.org/0000-0003-4695-9789>
В.Е. Франкевич / V.E. Frankevich: <https://orcid.org/0000-0002-9780-4579>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.
Financing. The work was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 10.05.2021. Принята к публикации: 03.06.2021.
Article submitter: 10.05.2021. Accepted for publication: 03.06.2021.