



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/50 (2022.08); A61B 5/00 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022130411, 24.11.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.11.2022

Дата регистрации:
31.01.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.11.2022

(45) Опубликовано: 31.01.2023 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

450008, г.Уфа, ул.Ленина, 3, ФГБОУ ВО
"БашГМУ", патентный отдел, Ахатов
Искандер Шаукатович

(72) Автор(ы):

Галимова Эльмира Фанисовна (RU),
Галимова Саида Шамилевна (RU),
Мочалов Константин Сергеевич (RU),
Галимов Шамиль Нариманович (RU),
Громенко Юлия Юрьевна (RU),
Громенко Дмитрий Сергеевич (RU),
Громенко Иван Дмитриевич (RU),
Громенко Дарья Дмитриевна (RU),
Галимов Камиль Шамилевич (RU),
Бодрова Елизавета Сергеевна (RU),
Муратов Эмиль Марсельевич (RU),
Гилязова Ирина Ришатовна (RU),
Павлов Валентин Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "БАШКИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2732968 C1, 25.09.2020. RU
2360247 C2, 27.06.2009. RU 2362167 C1,
20.07.2009. EP 2388588 A1, 23.11.2011. WO
2010049340 A1, 06.05.2010. US 7252642 B2,
07.08.2007. Сапожкова Ж.Ю., Милованова Г.А.,
Пацап О.И. Лабораторная диагностика
мужского бесплодия. Маркеры и методы.
Часть II // Лабораторная и клиническая
медицина. Фармация. 2021, т. 1, N 2, (см.
прод.)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ФЕРТИЛЬНОСТИ ЭЯКУЛЯТА ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОМ
БЕСПЛОДИИ

(57) Реферат:

Предлагаемое изобретение относится к
медицине, а именно к лабораторным методам
исследования в области биохимии,

патологической физиологии, андрологии.
Образцы эякулята получают путем мастурбации
в стерильный одноразовый пластиковый

контейнер. После сбора образцы оставляют разжижаться при температуре 37°C в течение 30 минут, эякулят центрифугируют в течение 10-15 минут, надосадочную жидкость переносят в 96-луночный планшет, в спермальной плазме колориметрическим методом при длине волны 450 нм определяют концентрацию восстановленного формазана, по которой

рассчитывают концентрацию никотинамидадениндинуклеотида окисленного (НАД⁺). При значении концентрации НАД⁺ 91-120 нмоль/10⁶ сперматозоидов диагностируют фертильность эякулята. Использование изобретения обеспечивает повышение точности и специфичности способа за счет оценки редокс-потенциала гамет. 1 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

с. 65 - 79. Xueyan Bai and Peng Wang. Relationship between sperm NAD⁺ concentration and reproductive aging in normozoospermia men: A Cohort study. Bai et al. BMC Urology (2022) 22:159. Published: 01 October 2022. Michael J. Bertoldo et al. NAD⁺ Repletion Rescues Female Fertility during Reproductive Aging. Cell Rep. Author manuscript; available in PMC 2020 Mar 10. Published in final edited form as: Cell Rep. 2020 Feb 11; 30(6): 1670-1681.e7. PMID: 32049001.

RU 2789239 C1

RU 2789239 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/50 (2022.08); A61B 5/00 (2022.08)(21)(22) Application: **2022130411, 24.11.2022**

(24) Effective date for property rights:
24.11.2022

Registration date:
31.01.2023

Priority:

(22) Date of filing: **24.11.2022**(45) Date of publication: **31.01.2023** Bull. № 4

Mail address:

**450008, g.Ufa, ul.Lenina, 3, FGBOU VO
"BashGMU", patentnyj otdel, Akhatov Iskander
Shaukatovich**

(72) Inventor(s):

**Galimova Elmira Fanisovna (RU),
Galimova Saida Shamilevna (RU),
Mochalov Konstantin Sergeevich (RU),
Galimov Shamil Narimanovich (RU),
Gromenko Iuliia Iurevna (RU),
Gromenko Dmitrii Sergeevich (RU),
Gromenko Ivan Dmitrievich (RU),
Gromenko Daria Dmitrievna (RU),
Galimov Kamil Shamilevich (RU),
Bodrova Elizaveta Sergeevna (RU),
Muratov Emil Marselevich (RU),
Giliazova Irina Rishatovna (RU),
Pavlov Valentin Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia «BASHKIRSKII
GOSUDARSTVENNYI MEDITSINSKII
UNIVERSITET» Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)**

(54) **METHOD FOR DIAGNOSING EJACULATE FERTILITY IN IDIOPATHIC INFERTILITY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: present invention relates to medicine, namely to laboratory research methods in the field of biochemistry, pathological physiology, andrology. Ejaculate samples are obtained by masturbation into a sterile disposable plastic container. After collection, the samples are left to liquefy at a temperature of 37°C for 30 minutes, the ejaculate is centrifuged for 10-15 minutes, the supernatant is transferred into a 96-well plate, the concentration of

reduced formazan is determined in sperm plasma by colorimetric method at a wavelength of 450 nm, by which calculate the concentration of nicotinamide adenine dinucleotide oxidized (NAD⁺). When the concentration of NAD⁺ is 91-120 nmol/10⁶ spermatozoa, ejaculate fertility is diagnosed.

EFFECT: use of the invention provides an increase in the accuracy and specificity of the method by evaluating the redox potential of gametes.

1 cl, 1 tbl, 4 ex

Предлагаемое изобретение относится к медицине, а именно к лабораторным методам исследования в области биохимии, патологической физиологии, андрологии.

Одной из важнейших проблем здравоохранения остается бесплодие. В мире от бесплодия страдает 12-15% супружеских пар, т.е. проблема является глобальной и затрагивает, по некоторым оценкам, до 90 миллионов человек. В большинстве случаев механизмы развития бесплодия у мужчин остаются неясными, т.е. речь идет об идиопатическом бесплодии. В России число мужчин с бесплодием за последние 20 лет увеличилось более чем в 2 раза. Несмотря на достижения в области репродуктивной медицины, идиопатическое бесплодие, при котором изменяются характеристики эякулята без установленной причины в отсутствие женского фактора, остается сложной задачей для диагностики и лечения. В этой связи актуальна разработка и внедрение передовых технологий, направленных на совершенствование методов лабораторной диагностики бесплодия. Никотинамидным ко ферментам (никотинамидадениндинуклеотиду окисленному и восстановленному - НАД⁺ и НАДН) принадлежит уникальная роль в сперматогенезе и репродуктивном здоровье мужчин.

Одним из критериев диагностики мужского бесплодия является анализ спермограммы [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO (Geneva), 2010.; Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пер. с англ. Н.П. Макаровой под научн. ред. Л.Ф. Курило. 5-е изд. - М.: Изд-во "Капитал принт", 2012]. Метод лабораторного исследования спермограммы имеет свои недостатки: 1. Анализ основан лишь на визуальном исследовании функционально-морфологических критериев сперматозоидов и не дает возможности выявить биохимические и патофизиологические нарушения в мужских половых клетках.

2. Носит субъективный характер, зависящий от лабораторных навыков лаборанта.

Известен способ определения суммарной антиокислительной активности спермоплазмы для оценки мужской фертильности, характеризующийся тем, что регистрируют железоиндуцируемую хемилюминесценцию модельной системы, затем проводят повторную регистрацию хемилюминесценции при добавлении спермоплазмы, определяют суммарную антиокислительную активность спермоплазмы по формуле: $SAOA = (SMCCP / SMC) \cdot 100\%$, где SАОА - суммарная антиокислительная активность; SMC - светосумма модельной системы; SMCCП - светосумма модельной системы + спермоплазма. Эякулят оценивают как фертильный при значении суммарной антиокислительной активности спермоплазмы, равной 35-43% [патент RU 2278382, 2006].

Известен способ оценки фертильных свойств эякулята для диагностики мужского бесплодия, включающий определение показателя электрофоретической подвижности сперматозоидов, при этом снижение показателя электрофоретической подвижности сперматозоидов ниже 11,65 мкм/с свидетельствует о нарушении фертильных свойств исследуемого эякулята [патент RU 2348933, 2009]. Известен способ оценки качества эякулята по содержанию сперматозоидов с гидроксиметилированной ДНК, характеризующийся тем, что проводят фиксацию сперматозоидов на предметных стеклах и детектируют содержание гидроксиметилированной ДНК методом иммунофлуоресценции, при этом оценивают не менее 5000 индивидуальных сперматозоидов. Нормой считают долю сперматозоидов с гидроксиметилированной ДНК, не превышающую 0,5% от общего проанализированного количества сперматозоидов [патент RU 2673472, 2018].

Наиболее близким аналогом изобретения является способ определения качества эякулята у мужчин по активности креатинфосфокиназы в спермальной плазме,

закрывающийся в том, что осуществляют сбор образца эякулята, полученный путем мастурбации и семяизвержения в чистый контейнер из пластика, доставку в лабораторию в течение 30 минут при температуре от 20 до 37°C, помещение в термостат при 37°C для разжижения. Центрифугируют в течение 10 мин при 1000 g. Переносят в чистую пробирку и определяют активность креатинфосфокиназы на автоматическом биохимическом анализаторе кинетическим методом. Интерпретацию результатов проводят следующим образом: активность креатинфосфокиназы более 362,3 Е/л соответствует нормозооспермии, от 167,0 до 362,3 Е/л включительно соответствует олигозооспермии, от 109,4 до 167,0 Е/л включительно соответствует криптозооспермии, активность КФК ниже 109,4 Е/л включительно соответствует азооспермии по данным спермограммы [патент RU 2732968, 2020]. Недостаток данного способа состоит в том, что определяется не комплексный показатель, например, редокс-потенциал сперматозоидов, а анализируется лишь один из параметров энергипотенциала: активность креатинфосфокиназы.

Задачей изобретения является разработка способа диагностики фертильности эякулята при мужском бесплодии на основе определения уровня НАД⁺, позволяющего выявить нарушения окислительно-восстановительных процессов в мужских гаметах, в том числе сопряженных с патологией гаметогенеза, репарации ДНК, регуляции апоптоза и ранним старением гамет.

Технический результат при использовании способа - повышение точности и специфичности способа за счет оценки редокс-потенциала гамет.

Предлагаемый способ оценки фертильности эякулята при мужском бесплодии осуществляется следующим образом: образцы эякулята получают путем мастурбации в стерильный одноразовый пластиковый контейнер. После сбора образцы оставляют разжижаться при температуре 37°C в течение 30 минут. При микроскопическом исследовании определяют количество сперматозоидов, процент подвижных сперматозоидов и сперматозоидов с нормальной морфологией. Количество сперматозоидов и процент подвижных сперматозоидов оценивают в соответствии со стандартами, установленными ВОЗ (2010).

Для измерения концентрации НАД⁺ используют колориметрический метод (NAD/NADH Cell-Based Assay Kit, Cayman Chemical, США) на 96-луночном планшетном анализаторе, способном измерять оптическую плотность при 450 нм в соответствии с инструкцией производителя. Эякулят центрифугируют в объеме не менее 300 мкл в течение 10-15 минут, надосадочную жидкость в объеме 100 мкл переносят в 96-луночный планшет. Каждую реакцию проводят в двух репликах. После промывки и лизиса 100 мкл супернатанта переносят в соответствующие лунки планшета. После инкубации в течение 30 мин с реагентом - солями тетразолия измеряют оптическую плотность каждого образца при длине волны 450 нм, затем определяют концентрацию восстановленного формазана, по которой рассчитывают концентрацию никотинамидадениндинуклеотида окисленного НАД⁺ в клеточном лизате [Kit Booklet NAD/NADH Cell-Based Assay Kit, Cayman Chemical, 2017]. При значении концентрации НАД⁺ в интервале, равном 91-120 нмоль/10⁶ сперматозоидов, диагностируют фертильность эякулята.

Разработанный метод определения уровня НАД⁺ рекомендуется применять для оценки мужской инфертильности в клинической андрологии как эффективный дополнительный метод диагностики. Данный метод позволяет до исследования спермограммы определить энергетический потенциал гамет и прогнозировать раннее

старение сперматозоидов со снижением фертилизации.

Предлагаемым способом была проведена оценка фертильности у 30 фертильных и 65 бесплодных мужчин. Анализ результатов показал достоверные изменения в показателях эякулята и концентрации НАД⁺ у обследованных пациентов по возрастным категориям (таблица). Из таблицы видно, что если показатели не входят в диапазон референсных значений, то отмечается снижение оплодотворяющей способности сперматозоидов.

Таблица

Показатели эякулята и НАД⁺ у обследованных пациентов по возрастным категориям (M±m)

Показатель	Группа			
	Фертильные (n=30)	Бесплодные(n=65)		
		>30 лет	30-40 лет	>40 лет
Концентрация НАД ⁺ нмоль/10 ⁶	91,25±13,23	91,61±15,53	115,25±16,55*	125,60±16,29*
Объем эякулята, мл	3,6±0,2	3,5±0,2	2,9±0,32*	2,8±0,42*
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	71,2±5,4	41,8 ± 5,3*	30,6 ± 2,4*	22,9 ± 2,3*
Прогрессивно-подвижные сперматозоиды, %	44,7±2,4	37,9±2,8*	30,9±1,8*	24,6±1,8*
Морфологически нормальные формы, %	60,3±5,9	30,3±3,9*	25,3±2,6*	20,9±5,8*

*- различие с фертильными мужчинами статистическим значимы при $p < 0,05$

Сущность изобретения поясняется следующими клиническими примерами.

Пример 1.

Супружеская пара Н. обратилась в клинику ВРТ «Семья» г. Уфы по поводу первичного бесплодия в течение 3 лет. Возраст супруги 26 лет, супруга 31 год. При проведении обследования эякулята супруга концентрация НАД⁺ составила 91 нмоль/10⁶ сперматозоидов, эякулят оценивают как фертильный. При стандартном лабораторном исследовании эякулята не было выявлено отклонений от нормы: показатель подвижности составил 51% (категория А - 35%, категория В - 16%), показатель сперматозоидов с нормальной морфологией 30%, концентрация 84 млн/мл. У супруги при обследовании патологии выявлен трубно-перитонеальный фактор бесплодия. Заключение: диагностирован женский трубно-перитонийный фактор бесплодия. У супруга: нормозооспермия.

Пример 2.

Пациент Г., возраст 34 года, супруга М., возраст 30 лет, состояли в бесплодном браке в течение 6 лет. В анамнезе 3 неудачные попытки ЭКО и ЭКО-ИКСИ в различных

клиниках ВРТ. При обследовании супруги патологических нарушений со стороны репродуктивной системы выявлено не было. При проведении обследования эякулята супруга концентрация НАД⁺ составила 164 нмоль/10⁶ сперматозоидов, эякулят оценивают как инфертильный. При лабораторном исследовании эякулята не было выявлено существенных отклонений от нормы: показатель подвижности составил 48% (категория А - 30%, категория В - 18%), показатель сперматозоидов с нормальной морфологией 22%, концентрация 44 млн/мл. Женский фактор без патологии. Заключение. Исследование спермограммы не позволило установить причину снижения оплодотворяющей сперматозоидов и нарушения фертильной функции. Результат проведенного анализа уровня НАД⁺ соответствует показателям инфертильного эякулята. Показатели проведенного анализа соответствуют закономерностям, установленным другим методом *in vitro* диагностики фертильности, определяющим нарушения окислительно-восстановительных процессов в мужских гаметах [патент RU №2272291].

Пример 3.

Супружеская пара 3. обратилась в клинику ВРТ г. Уфы по поводу первичного бесплодия в течение 2 лет. Возраст супруги 30 лет, супруга 33 года. При проведении обследования эякулята супруга концентрация НАД⁺ составила 120 нмоль/10⁶ сперматозоидов, эякулят оценивают как фертильный. При стандартном лабораторном исследовании эякулята не было выявлено отклонений от нормы: показатель подвижности составил 55% (категория А - 38%, категория В - 17%), показатель сперматозоидов с нормальной морфологией 42%, концентрация 88 млн/мл. У супруги при обследовании выявлено патология женского бесплодия воспалительного происхождения (хронического сальпингоофоритат). Заключение: диагностирован женский фактор бесплодия - хронический сальпингоофорит. У супруга: нормозооспермия.

Пример 4.

Супружеская пара Р. обратилась в клинику ВРТ «Семья» г. Уфы по поводу первичного бесплодия в течение 1,5 лет. Возраст супруги 23 лет, супруга 24 года. При проведении обследования эякулята супруга концентрация НАД⁺ составила 80 нмоль/10⁶ сперматозоидов, эякулят оценивают как инфертильный. При стандартном лабораторном исследовании эякулята не было выявлено отклонений от нормы: показатель подвижности составил 46% (категория А - 30%, категория В - 16%), показатель сперматозоидов с нормальной морфологией 29%, концентрация 46 млн/мл. Результат проведенного анализа уровня НАД⁺ соответствует показателям инфертильного эякулята. Женский фактор без патологии.

Таким образом, приведенные примеры демонстрируют, что предлагаемый метод определения НАД⁺ позволяет выявить нарушения репродуктивной функции мужчин до исследования спермограммы. Преимущества заявляемого метода:

1. Данный метод является эффективным биомаркером диагностики идиопатического мужского бесплодия, а также перспективным предиктором позитивного/негативного исхода ЭКО.

2. На основе данного метода возможен первичный скрининг образцов эякулята фертильных доноров спермы.

(57) Формула изобретения

Способ диагностики фертильности эякулята при мужском бесплодии, включающий сбор эякулята, полученного путем мастурбации, инкубацию в термостате при 37°C для разжижения, центрифугирование и определение колориметрическим методом содержания окрашенного комплекса в спермальной плазме, отличающийся тем, что в качестве
5 окрашенного комплекса при длине волны 450 нм определяют концентрацию восстановленного формазана, по которой рассчитывают концентрацию никотинамидадениндинуклеотида окисленного (НАД⁺), и при значении концентрации НАД⁺ 91-120 нмоль/10⁶ сперматозоидов диагностируют фертильность эякулята.

10

15

20

25

30

35

40

45