

УДК: 573.6:577.21-076

Дослідження вмісту анеуплоїдних сперматозоїдів та сперматозоїдів, що несуть фрагментовану ДНК, у чоловіків з підвищеною кількістю незрілих сперматозоїдів у еякуляті

О.М.Феськов, І.А.Феськова, Є.С.Жилкова, О.В.Блажко

*Клініка професора О.М.Феськова, «Центр Репродукції Людини» (Харків, Україна)
zhilkova@feskov.com.ua; zhilkova@mail.ru*

Проведено дослідження для визначення ступеню зрілості, вмісту анеуплоїдних сперматозоїдів та сперматозоїдів з фрагментованою ДНК для чоловіків з різними видами патоспермії. Установлений зв'язок між порушеннями процесу дозрівання сперматозоїдів та наявністю чисельних хромосомних аномалій та пошкодженнями ДНК сперматозоїдів у чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією. Виявлено значне підвищення вмісту незрілих сперматозоїдів в еякуляті у чоловіків з астенозооспермією та значне підвищення кількості анеуплоїдних сперматозоїдів у чоловіків з олігозооспермією у порівнянні з відповідними показниками у чоловіків з іншими видами патоспермії ($p < 0,05$).

Ключові слова: *ступінь зрілості сперматозоїдів, фрагментація ДНК, анеуплоїдії, патоспермія.*

Исследование содержания анеуплоидных сперматозоидов и сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, у мужчин с повышенным содержанием незрелых сперматозоидов в эякуляте

А.М.Феськов, І.А.Феськова, Є.С.Жилкова, О.В.Блажко

Проведены исследования для определения степени зрелости, содержания анеуплоидных сперматозоидов и сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, для мужчин с различными видами патоспермии. Установлена связь между нарушениями процесса созревания сперматозоидов и наличием численных хромосомных аномалий и нарушением целостности ДНК сперматозоидов у мужчин со сниженной репродуктивной функцией. Виявлено значительное превышение содержания незрелых сперматозоидов для мужчин с астенозооспермией и значительное превышение содержания анеуплоидных сперматозоидов для мужчин с олигозооспермией по сравнению с данными показателями у мужчин с другими видами патоспермии ($p < 0,05$).

Ключевые слова: *степень зрелости сперматозоидов, фрагментация ДНК, анеуплоидии, патоспермия.*

Examination of the aneuploid spermatozoa's and spermatozoa's with fragmented DNA content in men with high content of the immature spermatozoa in the ejaculate

O.M.Fes'kov, I.A.Fes'kova, Ye.S.Zhylkova, O.V.Blazhko

The examination to determine the stage of spermatozoa maturity, the content of aneuploid spermatozoa and of spermatozoa with fragmented DNA for men with the different types of pathospermia was carried out. The correlation between the abnormalities in the semen maturity process and the presence of sperm aneuploidies and sperm DNA fragmentation was found out in men with poor reproductive function. A significant increase of the number of immature spermatozoa in ejaculate was found out in cases of asthenozoospermia; a significant increase of the number of aneuploid spermatozoa in ejaculate was found out in cases of oligozoospermia ($p < 0,05$).

Key words: *stage of semen maturity, DNA fragmentation, aneuploidies, pathospermia.*

Введение

В настоящее время нарушениям отцовского генома уделяется все большее внимание в репродуктивной медицине. Использование классического анализа спермы не всегда позволяет выявить отцовский эффект, обуславливающий нарушения эмбрионального развития (Воробьева и др., 2005; Findikli et al., 2004). Отцовский эффект может быть связан с такими генетическими факторами, как генные мутации, микроделеции, анеуплоидии, повреждения ДНК и нарушения компактизации

хроматина (Cayli et al., 2004; Dohle et al., 2010; Sarah et al., 1997). Сперматогенез – это сложный многостадийный процесс развития и созревания сперматозоидов из незрелых половых клеток. В среднем, продолжительность созревания сперматозоида занимает около двух с половиной месяцев. Нормальное протекание сперматогенеза требует скоординированного влияния многочисленных факторов (генетических, клеточных, гормональных и других). Следствием нарушения процесса созревания может быть наличие анеуплоидий в ядрах сперматозоидов, а также фрагментация ДНК сперматозоидов (Henkel et al., 2003). Фрагментация ДНК сперматозоидов – относительно недавно открытая причина мужского бесплодия, которая интенсивно исследуется в последнее десятилетие. Она включает двухцепочечные и одноцепочечные разрывы молекулы ДНК. Причинами разрывов ДНК считают процессы изменения структуры хроматина в ходе сперматогенеза и апоптоз. Для оценки фрагментации ДНК и апоптотических маркеров сперматозоидов в настоящее время разработан целый ряд методических подходов. Высокий процент сперматозоидов с повреждениями ДНК не всегда коррелирует с обычными параметрами спермограммы. В то же время фрагментация ДНК сперматозоидов может оказывать влияние на ранние этапы эмбрионального развития (Tesarik et al., 2002; Hong Ye et al., 2006). Нарушение подвижности сперматозоидов (астенозооспермия), снижение концентрации (олигозооспермия) и нарушение морфологии сперматозоидов (тератозооспермия) могут свидетельствовать о наличии численных или структурных хромосомных патологий в ядрах сперматозоидов (Oehninger et al., 1998; Calle et al., 2008; Seli, Sakkas, 2005). Целью данной работы было исследовать содержание анеуплоидных сперматозоидов и сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, у мужчин с высоким уровнем незрелых сперматозоидов в эякуляте.

Методика

В ходе данного эксперимента было обследовано 120 мужчин с нормальным мужским кариотипом 46, XY с целью определения степени зрелости сперматозоидов и исследования содержания анеуплоидных сперматозоидов и сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК. Из них: 45 мужчин с астенозооспермией, 34 мужчины с олигозооспермией и 21 пациент с тератозооспермией; группу контроля составили 20 пациентов с заключением спермограммы «нормозооспермия». Средний возраст пациентов был $39,5 \pm 4,3$ лет.

С целью проведения анализа фрагментации ДНК сперматозоидов был использован метод SCD (sperm chromatin dispersion) (HaloSperm, Halotech, Испания). Метод основан на дисперсии хроматина вокруг ядра, за счет чего можно различить сперматозоиды с различной степенью фрагментации ДНК. В ходе протокола исследования методом SCD сперма была разведена PBS (phosphate buffer saline, Sigma) до концентрации 5–10 млн/мл. Разведенные образцы спермы были помещены на покрытые агарозным гелем предметные стекла, заранее прогретые до температуры 90–95°C; а затем прошли обработку кислотным и лизисным растворами. С целью дегидратации зафиксированные на стеклах препараты были отмыты в 70%, 90% и 96% растворах этанола. Анализ был проведен с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse 80i. В качестве основного флуорохрома был использован реактив DAPI II (Vysis-Abbott, США). Результат был задокументирован с помощью цитогенетической программы Lucia FISH (LIM, Чехия). Содержание в эякуляте сперматозоидов, содержащих фрагментированную ДНК, в норме не должно было превышать 20% (Brugnon et al., 2006).

Исследование степени зрелости сперматозоида основано на селекции сперматозоидов по степени связывания с гиалуроновой кислотой (hyaluron binding assay, HBA-тест). Метод основан на снижении подвижности зрелого сперматозоида из-за связывания с гиалуронатом. В организме человека гиалуроновая кислота (гиалуронат) является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса и содержится в больших количествах между кумулюсными клетками и зрелым ооцитом. Только полностью зрелый сперматозоид с интактной ДНК имеет на головке специальные рецепторы и способен эффективно связываться с гиалуронатом (Seli, Sakkas, 2005; Findikli et al., 2004). Для определения содержания зрелых сперматозоидов в эякуляте были использованы наборы компании Biocoat Incorporation (США). С целью проведения анализа неразведенный образец спермы помещался на предметное стекло, обработанное гиалуроновой кислотой (ГК). Степень зрелости определялась по снижению подвижности зрелого сперматозоида из-за связывания с ГК. В норме содержание незрелых сперматозоидов в эякуляте не должно было превышать 20% (Agarwal, Said, 2003).

Для выявления анеуплоидий в ядрах сперматозоидов по хромосомам 18, 21, X, Y был применен метод флуоресцентной гибридизации in situ (fluorescence hybridization in situ, FISH). Для проведения

исследования сперма изначально была отмыта с помощью раствора PBS (phosphate buffer saline, Sigma). После каждый исследуемый образец был зафиксирован с помощью 96% этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Зафиксированный препарат был выдержан при температуре -20°C в течение 12–14 часов. Для последующей отмытки и фиксации были использованы растворы 70%, 90% и 96% этанола. Для флуоресцентной гибридизации были применены следующие ДНК-зонды: CEP Y (DYZ3) Satellite DNA SpectrumOrange, CEP X (DXZ1) Alpha Satellite DNA SpectrumGreen, CEP 18(D18Z1) Alpha Satellite DNA SpectrumAqua, LSI 21 (loci D21S259, D21S341, D21S342, region 21q22.13-q22.2) SpectrumOrange (Vysis-Abbott, США). С целью денатурации ДНК препарат с добавленными ДНК-зондами был в течение 10 минут выдержан при температуре 75°C. Последующая гибридизация ДНК-зонда с ДНК-мишенью занимала 5 часов при температуре 42°C. Анализ флуоресцентного сигнала был проведен с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse 80i. Полученный результат был обработан с помощью цитогенетической программы Lucia FISH (LIM, Чехия). В норме содержание анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте не должно превышать 1,0% (Sarah et al., 1997).

Полученные данные статистически обработаны с помощью ф-критерия Фишера. Связь между повышенным содержанием незрелых сперматозоидов и содержанием анеуплоидных сперматозоидов, а также сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, была проанализирована путем определения коэффициента корреляции Пирсона (Гланц, 1999).

Результаты

Для 17 мужчин (14,2% обследуемых) содержание незрелых сперматозоидов, сперматозоидов с поврежденной ДНК и анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте было в пределах нормы. У 21 пациента (17,5% мужчин) содержание незрелых и анеуплоидных сперматозоидов превышало норму, однако процент сперматозоидов с фрагментированной ДНК был менее 20,0%. Для 33 мужчин (27,5% пациентов) содержание незрелых сперматозоидов и сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, превышало норму, однако процент анеуплоидных сперматозоидов был менее 1,0%. У 34 пациентов (28,3% мужчин) содержание незрелых сперматозоидов и сперматозоидов с фрагментированной ДНК было менее 20,0%, в то время как содержание анеуплоидных сперматозоидов превысило 1,0%. У оставшихся 15 мужчин (12,5% пациентов) содержание незрелых сперматозоидов, сперматозоидов с поврежденной ДНК и анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте превышало допустимые значения. Результаты приведены в табл. 1. Сперматозоиды, несущие нормальную и фрагментированную ДНК, представлены на рис. 1. Анеуплоидное ядро сперматозоида представлено на рис. 2.

Таблица 1.

Содержание анеуплоидных сперматозоидов и сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, при нормальном и высоком содержании незрелых сперматозоидов в эякуляте

| Результат исследования | Количество пациентов, N | Количество пациентов, % |
|---|-------------------------|-------------------------|
| НВА-тест: менее 20,0%; SCD-тест: менее 20,0%; анеуплоидные ядра: менее 1,0% | 17 | 14,2 |
| НВА-тест: более 20,0%; SCD-тест: менее 20,0%; анеуплоидные ядра: более 1,0% | 21 | 17,5 |
| НВА-тест: более 20,0%; SCD-тест: более 20,0%; анеуплоидные ядра: менее 1,0% | 33 | 27,5 |
| НВА-тест: менее 20,0%; SCD-тест: менее 20,0%; анеуплоидные ядра: более 1,0% | 34 | 28,3 |
| НВА-тест: более 20,0%; SCD-тест: более 20,0%; анеуплоидные ядра: более 1,0% | 15 | 12,5 |



Рис. 1. Анализ фрагментации ДНК сперматозоидов методом SCD

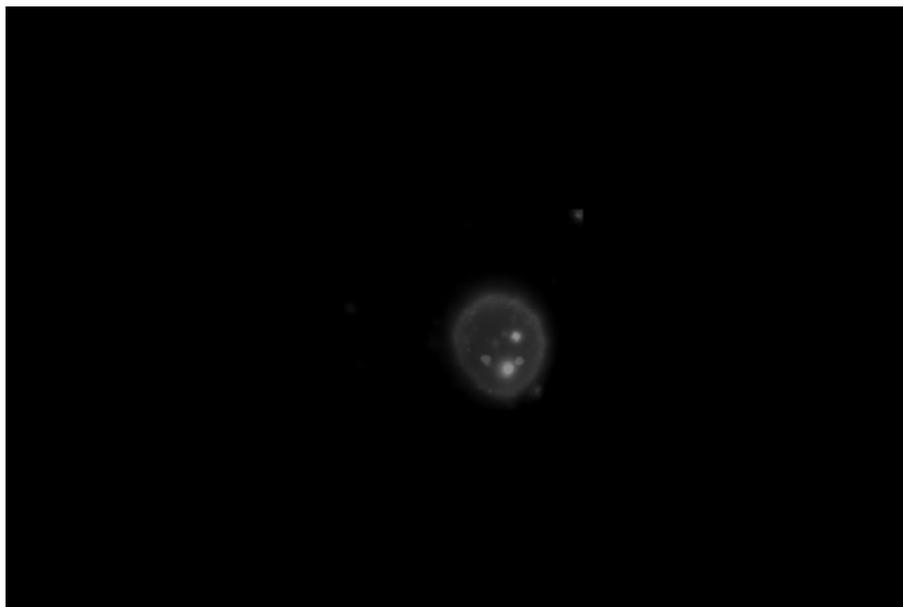


Рис. 2. Анеуплоїдний сперматозоїд: YY, 18 18 (хромосома Y – червоні сигнали, хромосома 18 – сині сигнали)

Среди 69 мужчин, для которых было выявлено высокое содержание незрелых сперматозоидов в эякуляте, 38 пациентов имели заключение спермограммы «астенозооспермия» (84,4% случаев астенозооспермии), 19 пациентов – с олигозооспермией (55,9% случаев олигозооспермии), 10 пациентов – с тератозооспермией (47,6% мужчин с тератозооспермией). В контрольной группе высокое содержание сперматозоидов с фрагментированной ДНК было выявлено у 2 пациентов (10,0% пациентов с нормозооспермией). Полученные данные представлены в табл. 2.

Среди 70 мужчин, для которых было выявлено высокое содержание анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте, 21 пациент имел заключение спермограммы «астенозооспермия» (46,7% случаев астенозооспермии), 29 пациентов – с олигозооспермией (85,3% случаев олигозооспермии),

15 пациентов – с тератозооспермией (71,4% мужчин с тератозооспермией). В контрольной группе высокое содержание анеуплоидных сперматозоидов было выявлено у 5 пациентов (25,0% мужчин с нормозооспермией). Полученные данные представлены в табл. 3.

Таблица 2.
Содержание незрелых сперматозоидов в эякуляте для мужчин с различными видами патоспермии и нормозооспермией

| Заключение спермограммы | НВА-тест: содержание незрелых сперматозоидов более 20,0% | |
|-------------------------|--|-------------------------|
| | Количество пациентов, N | Количество пациентов, % |
| Олигозооспермия | 19 | 55,9 |
| Астенозооспермия | 38 | 84,4 |
| Тератозооспермия | 10 | 47,6 |
| Нормозооспермия | 2 | 10,0 |

Таблица 3.
Содержание анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте для мужчин с различными видами патоспермии и нормозооспермией

| Заключение спермограммы | Содержание анеуплоидных сперматозоидов более 1,0% | |
|-------------------------|---|-------------------------|
| | Количество пациентов, N | Количество пациентов, % |
| Олигозооспермия | 29 | 85,3 % |
| Астенозооспермия | 21 | 46,7 % |
| Тератозооспермия | 15 | 71,4 % |
| Нормозооспермия | 5 | 25,0 % |

Обсуждение

Корреляция между результатами НВА-теста и анализа фрагментации ДНК сперматозоидов была установлена в 82,5% случаев, что подтверждает возможность селективного метода, основанного на связывании гиалуроновой кислоты, выявлять сперматозоиды, несущие неповрежденную ДНК (Schlegel, Paduch, 2005). Содержание незрелых сперматозоидов в эякуляте значительно ($p < 0,05$) выше у пациентов с показателями спермограммы, отличными от нормы, в сравнении с пациентами с нормозооспермией. Выявлено значительное превышение незрелых сперматозоидов, для мужчин с астенозооспермией по сравнению с наличием незрелых форм сперматозоидов в эякуляте для мужчин с олиго- и тератозооспермией ($p < 0,05$). Корреляция между результатами НВА-теста и содержанием анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте была установлена в 44,2% случаев. Исследование содержания сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, является актуальным при лечении мужского бесплодия, учитывая тот факт, что сперматозоиды даже со значительным уровнем повреждений ДНК сохраняют способность оплодотворять ооциты. Однако в дальнейшем эмбриональное развитие может блокироваться на разных этапах. Многие авторы доказывают, что фрагментация ДНК не оказывает влияния на оплодотворение, но имеет важное значение для формирования бластоцист и имплантации (Benchaib et al., 2003; Seli, Sakkas, 2004).

Выявлено значительное превышение содержания анеуплоидных сперматозоидов для мужчин с олигозооспермией по сравнению с наличием анеуплоидий в ядрах сперматозоидов для мужчин с олиго- и тератозооспермией ($p < 0,05$). Исследование зависимости между содержанием анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте и показателями спермограммы является актуальным, учитывая неоднозначность и противоречивость приведенных ранее данных (Курило и др., 2000; Pandiyan, Jequier, 1996; Hong Ye et al., 2006).

Выводы

Данная работа подтверждает связь между нарушениями процесса созревания сперматозоидов и наличием численных хромосомных аномалий и нарушением целостности ДНК сперматозоидов у мужчин со сниженной репродуктивной функцией. Данное исследование подтверждает необходимость проведения генетического тестирования для мужчин с различными видами патоспермии. Исследование содержания анеуплоидных сперматозоидов и сперматозоидов, несущих

фрагментированную ДНК, а также содержания незрелых сперматозоидов в эякуляте имеет диагностическое и прогностическое значение для мужчин с параметрами спермограммы, отличными от нормы.

Список литературы

- Воробьева О.А., Воскресенская А.В., Одинцов А.А., Филатов М.В. Мужское бесплодие и нарушение структурной организации хроматина сперматозоидов. Существует ли связь? // Проблемы репродукции. – 2005. – №6. – С. 56–62. /Vorobyova O.A., Voskresenskaya A.V., Odintsov A.A., Filatov M.V. Muzhskoye besplodiye i narusheniye strukturnoy organizatsii khromatina spermatozoidov. Suschestvuyet li svyaz'? // Problemy reproduksii. – 2005. – №6. – С. 56–62./
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 460с. /Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. – М.: Praktika, 1999. – 460s./
- Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Сорокина Т.М., Гришина Е.М. Структура наследственных нарушений репродуктивной системы // Вест. РАМН. – 2000. – №5. – С. 32–36. /Kurilo L.F., Shileyko L.V., Sorokina T.M., Grishina Ye.M. Struktura nasledstvennykh narusheniy reproductivnoy sistemy // Vest. RAMN. – 2000. – №5. – С. 32–36./
- Agarwal A., Said T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility // Hum. Reprod. – 2003. – Vol.19. – №4. – P. 331–345.
- Benchaib M., Braun V., Lornage J. et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique // Hum. Reprod. – 2003. – Vol.18, №5. – P. 1023–1028.
- Brugnon F., Van Assche E., Verheyen G. et al. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients // Hum. Reprod. – 2006. – Vol.21, №3. – P. 683–685.
- Calle J.F., Muller A., Walschaerts M. et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study // Fertility and Sterility. – 2008. – Vol.19, №6. – P. 671–682.
- Cayli S., Sakkas D., Vigue L. et al. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl_{xL} levels in mature and diminished maturity sperm // Mol. Hum. Reprod. – 2004. – Vol.10, №5. – P. 365–372.
- Dohle G.R., Diemer T., Giwercman A. et al. Мужское бесплодие (научное редактирование: Акопян А.С.) / Европейская ассоциация урологов. – 2010. – 67с. /Dohle G.R., Diemer T., Giwercman A. et al. Muzhskoye besplodiye (nauchnoye redaktirovaniye: Akopyan A.S.) / Evropeyskaya assotsiatsiya urologov. – 2010. – 67s./
- Findikli N., Kahraman S., Kumtepe Y. Assessment of DNA fragmentation and aneuploidy on poor quality human embryos // Reprod. Biomed. Online. – 2004. – Vol.8, №2. – P. 196–206.
- Henkel R., Kierspel E., Hajimohammad M. et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology // Reprod. Biomed. Online. – 2003. – №7. – P. 477–484.
- Hong Ye, Guo-ning Huang, Yang Gao, De Yi Liu Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional *in vitro* fertilization // Hum. Reprod. – 2006. – Vol.21, №6. – P. 1545–1550.
- Oehninger S., Chaturvedi S., Toner J. et al. Semen quality is there a paternal effect on pregnancy outcome in in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection? // Hum. Reprod. – 1998. – №13. – P. 2161–2164.
- Pandiyani N., Jequier A. Meiotic structural chromosomal abnormalities of 1210 infertile males // Hum. Reprod. – 1996. – Vol.11, №12. – P. 1321–1326.
- Sarah E.D., Sean P.F., Colin D.M. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using in-situ hybridization // Molecular Human Reproduction. – 1997. – Vol.3, №7. – P. 585–598.
- Schlegel P.N., Paduch D.A. Yet another test of sperm chromatin structure // Fertil Steril. – 2005. – Vol.84, №4. – P. 854–859.
- Seli E., Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART // Hum. Reprod. Update. – 2005. – Vol.11, №4. – P. 337–349.
- Tesarik J., Mendoza C., Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI // Hum Reprod. – 2002. – №17. – P. 184–189.

Представлено: О.Ю.Лиманська / Presented by: O.Yu.Lymans'ka

Рецензент: Н.Є.Волкова / Reviewer: N.Ye.Volkova

Подано до редакції / Received: 23.01.2012