

УДК: 573.6:577.21-076

Исследование связи между нарушением компактизации хроматина и наличием анеуплоидий в ядрах сперматозоидов у мужчин со сниженной фертильностью
А.М.Феськов¹, Е.С.Жилкова¹, Н.Н.Сотник¹, А.М.Федота²

¹Центр репродукции человека «Клиника профессора А.М.Феськова» (Харьков, Украина)

²Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
zhilkova@feskov.com.ua; zhilkova@mail.ru

Исследована связь между наличием анеуплоидий и степенью фрагментации ДНК в ядрах сперматозоидов в эякуляте у мужчин разных возрастных групп со сниженной репродуктивной функцией. Обнаружена прямая корреляция между нарушением компактизации хроматина и хромосомными абберациями в ядрах сперматозоидов для мужчин старше 35 лет. Повышение количества анеуплоидных сперматозоидов ведет к увеличению уровня фрагментации ДНК спермы. Пороговым клинически значимым возрастом мужчины является возраст 35 лет.

Ключевые слова: мужское бесплодие, фрагментация ДНК сперматозоидов, хромосомные абберации.

Дослідження зв'язку між порушенням компактизації хроматину та наявністю анеуплоїдій в ядрах сперматозоїдів для чоловіків зі зниженою фертильністю
О.М.Феськов, Е.С.Жилкова, Н.М.Сотник, О.М.Федота

Досліджено зв'язок між наявністю анеуплоїдій та ступенем фрагментації ДНК в ядрах сперматозоїдів в еякуляті у чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією для пацієнтів різних вікових груп. Виявлено пряму кореляцію між порушенням компактизації хроматину та хромосомними абераціями в ядрах сперматозоїдів для чоловіків старше 35 років. Підвищення кількості анеуплоїдних сперматозоїдів веде до росту рівня ДНК сперми. Пороговим клінічно значимим віком чоловіка, що веде до зниження репродуктивної функції, є вік 35 років.

Ключові слова: чоловіче безпліддя, фрагментація ДНК сперматозоїдів, хромосомні аберації.

The study of correlation between chromatin compactization failures and sperm aneuploidies in men with low fertility
O.Feskov, I.Zhylkova, N.Sotnik, O.Fedota

The dependence between the presence of sperm aneuploidies and the level of sperm DNA fragmentation in ejaculate in different age groups of men with low reproductive function has been examined. The direct correlation for chromatin compactization failures and sperm chromosomes aberrations has been found out for men elder than 35 years old. The rising of quantity of aneuploid spermatozoa leads to increase of the sperm DNA fragmentation level. The critical clinically significant age that leads to male infertility is 35 years old.

Key words: male infertility, sperm DNA fragmentation, chromosomal aberrations.

Введение

В настоящее время в репродуктивной медицине все больше внимания уделяется мужскому бесплодию. Нарушение репродуктивной функции мужчины является причиной ненаступления беременности практически у 50% супружеских пар (Воробьева и др., 2005; Курило и др., 2000). Генетическая компонента мужского бесплодия включает хромосомные абберации и нарушения компактизации хроматина мужских гамет (Agarwal, Said, 2003; Benchaib et al., 2003). Отклонения, выявленные у пациента при проведении классического анализа спермограммы, могут свидетельствовать о наличии численных или структурных хромосомных патологий в ядрах сперматозоидов (Brugnon et al., 2006; Calle et al., 2008; Findikli et al., 2004). Следует отметить, что морфологический анализ сперматозоидов не дает информации о наличии хромосомных или генных нарушений в ядрах сперматозоидов. Развитие и применение метода флуоресцентной гибридизации

in situ (FISH) позволило идентифицировать наличие хромосомных анеуплоидий в ядрах сперматозоидов человека. Использование нескольких ДНК-зондов дает возможность исследовать наличие анеуплоидий сразу по нескольким хромосомам в одном ядре одновременно (Dohle et al., 2010).

Нарушение компактизации хроматина в ядрах сперматозоидов, или фрагментация ДНК – относительно недавно выявленная предполагаемая причина снижения фертильности у мужчин (Findikli et al., 2004; Henkel et al., 2003). Разрывы ДНК, выявляемые в эякуляторных сперматозоидах, могут являться следствием дефекта созревания в ходе сперматогенеза (репарации и ремоделинга). С другой стороны, не исключено, что такие дефекты могут служить факторами запуска апоптоза (Hong Ye et al., 2006). В среднем около 20% эякуляторных сперматозоидов мужчин с различными параметрами спермограммы выявляются как апоптотические. Установлено, что фрагментация ДНК, как следствие апоптоза, значительно ниже в группе мужчин с нормозооспермией по сравнению с группами мужчин с нарушениями параметров классической спермограммы. Предполагается, что апоптоз служит конечным результатом различных патологических состояний и системой деградации, контролирующей сперматогенез (Schlegel, Paduch, 2005; Seli, Sakkas, 2005; Tesarik et al., 2002). Аномалии хроматина сперматозоидов часто ассоциированы с низкими показателями спермограммы, однако многие исследователи констатируют, что параметры фрагментации не имеют четкой корреляции с такими параметрами спермы, как концентрация, подвижность, морфология, рекомендованными к исследованию ВОЗ (Benchaib et al., 2003). В то же время рядом авторов обнаружена отрицательная корреляция фрагментации ДНК с характеристиками спермограммы: концентрацией, подвижностью и процентом морфологически аномальных сперматозоидов (Muratori et al., 2008). Спорным также остается вопрос о зависимости степени фрагментации ДНК от возраста пациента (Luke et al., 2010). В Украине эта проблематика также исследована недостаточно, в связи с чем целью данной работы стало исследование связи между наличием анеуплоидий и степенью фрагментации ДНК в ядрах сперматозоидов в эякуляте у мужчин со сниженной репродуктивной функцией.

Методика

Для проведения исследования была сформирована группа из 25 мужчин, в возрасте от 28 до 54 лет, проходивших лечение бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) с использованием процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) на базе Центра репродукции человека, г. Харьков. От всех пробандов получено письменное информированное согласие на участие в данном исследовании.

Исследование анеуплоидий в ядрах сперматозоидов проведено методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Для флуоресцентной гибридизации применялись 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). Для 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 (Oehninger et al., 1998). Количество хромосом в ядре сперматозоида определялось по количеству флуоресцентных сигналов. Для каждого пациента было оценено не менее 400 ядер сперматозоидов. Анализ флуоресцентного сигнала проводился с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse 80i.

Анализ фрагментации ДНК сперматозоидов проводился методом SCD (sperm chromatin dispersion) (HaloSperm, Halotech, Испания). Метод основан на исследовании дисперсии хроматина вокруг ядра, что дает возможность различить сперматозоиды с различной степенью фрагментации ДНК. Методом SCD сперма была разведена PBS (phosphate buffer saline, Sigma) до концентрации 5–10 млн/мл. Разведенные образцы спермы помещались на покрытые агарозным гелем предметные стекла, заранее прогретые до температуры 90–95°C, а затем проходили обработку кислотным и лизисным растворами. Зафиксированные на стеклах препараты, с целью дегидратации, были отмыты в 70%, 90% и 96% растворах этанола. Результат задокументирован с помощью программы Lucia FISH (LIM, Чехия). Согласно рекомендациям Европейской ассоциации урологов, содержание сперматозоидов в эякуляте, содержащих фрагментированную ДНК, в норме не должно превышать 20% (Dohle et al., 2010; Speyer et al., 2012).

Статистический анализ дат, распределение которых не соответствовало закону нормального распределения, проводили непараметрическими методами. Исследование связей между признаками проводилось методом корреляционного анализа по Спирмену (Гланц, 1999). Статистические гипотезы проверены на уровне значимости 0,05. Расчёты выполнены в программе Statistica-6.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования не выявлено статистически значимой корреляции между наличием анеуплоидий и нарушением компактизации хроматина в ядрах для возрастной группы мужчин младше 35 лет (табл. 1). Средний возраст пациентов составил $30,9 \pm 1,9$ лет.

Таблица 1.

Связь между хромосомными абберациями и нарушением компактизации хроматина в ядрах сперматозоидов (группа мужчин младше 35 лет)

Хромосома	N	Среднее значение, %		R	Критическое значение	p
		Уровень анеуплоидий	Фрагментация ДНК			
13	10	$0,76 \pm 0,52$	$18,14 \pm 9,77$	0,38	0,64	$p > 0,05$
16	10	$0,72 \pm 0,26$	$18,14 \pm 9,77$	0,23	0,64	$p > 0,05$
18	10	$0,99 \pm 0,59$	$18,14 \pm 9,77$	-0,51	0,64	$p > 0,05$
21	10	$1,13 \pm 0,73$	$18,14 \pm 9,77$	-0,13	0,64	$p > 0,05$
X, Y	10	$1,34 \pm 0,94$	$18,14 \pm 9,77$	0,08	0,64	$p > 0,05$

Примечание: N – количество мужчин, R – коэффициент корреляции Спирмена, p – уровень значимости.

В то же время для группы пациентов старше 35 лет обнаружена статистически значимая прямая корреляция между наличием анеуплоидий по половым хромосомам и уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов (табл. 2). Средний возраст пациентов в данной исследуемой группе составил $39,7 \pm 4,4$ лет. Обнаруженная зависимость показывает, что повышение количества анеуплоидных сперматозоидов ведет к росту уровня фрагментации ДНК спермы. Соответственно, возрастной фактор можно рассматривать как причину нарушения митоза и упаковки хроматина сперматозоидов у пациентов с нарушенной репродуктивной функцией старше 35 лет.

Таблица 2.

Связь между хромосомными абберациями и нарушением компактизации хроматина в ядрах сперматозоидов (группа мужчин старше 35 лет)

Хромосома	N	Среднее значение, %		R	Критическое значение	p
		Уровень анеуплоидий	Фрагментация ДНК			
13	15	$0,77 \pm 0,33$	$14,38 \pm 5,07$	-0,25	0,52	$p > 0,05$
16	15	$0,7 \pm 0,25$	$14,38 \pm 5,07$	-0,41	0,52	$p > 0,05$
18	15	$0,98 \pm 0,62$	$14,38 \pm 5,07$	0,42	0,52	$p > 0,05$
21	15	$0,84 \pm 0,37$	$14,38 \pm 5,07$	0,05	0,52	$p > 0,05$
X, Y	15	$1,39 \pm 0,39$	$14,38 \pm 5,07$	0,53	0,52	$p < 0,05$

Примечание: N – количество мужчин, R – коэффициент корреляции Спирмена, p – уровень значимости.

Фото сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, представлено на рис. 1. Ядра анеуплоидных сперматозоидов представлены на рис. 2, 3.

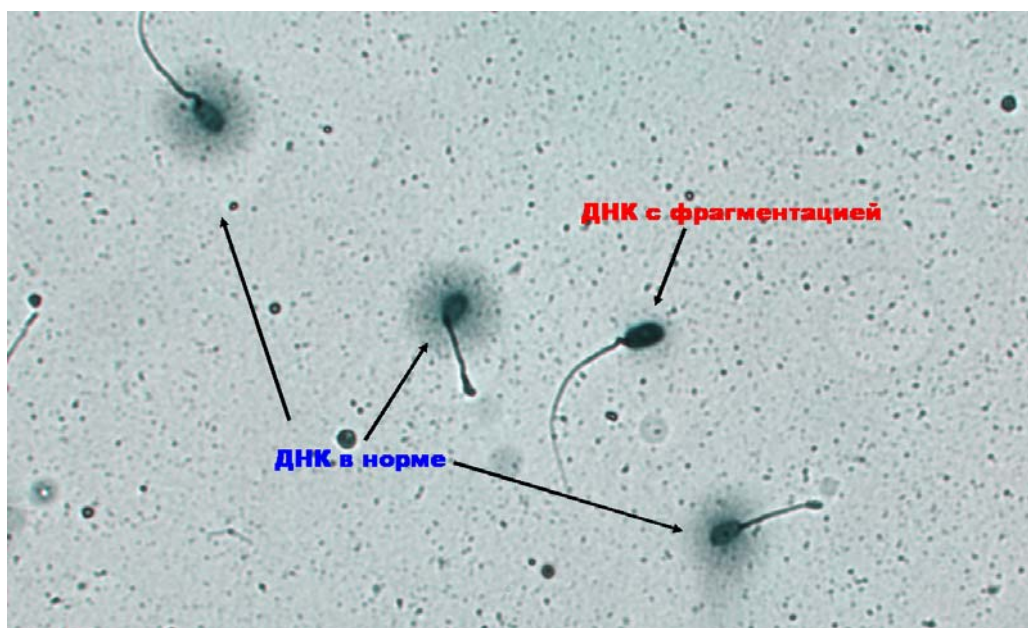


Рис. 1. Анализ фрагментации ДНК сперматозоидов методом SCD

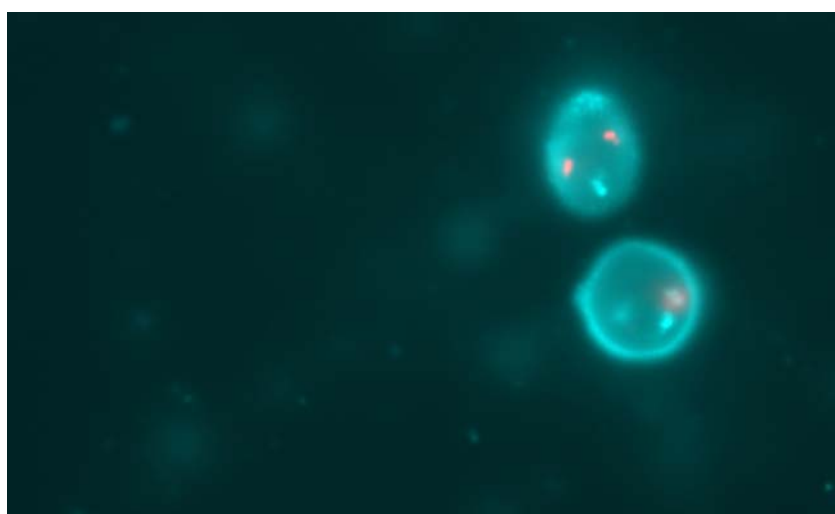


Рис. 2. Ядро анеуплоидного сперматозоида: красные сигналы – хромосомы 21, голубой сигнал – хромосома X

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что пороговым клинически значимым возрастом мужчин, для которого отмечена взаимосвязь количества анеуплоидных сперматозоидов и уровня фрагментации ДНК спермы, является возраст 35 лет. Данное заключение имеет важное клиническое значение, учитывая неоднозначность данных о возрастном факторе как о причине снижения мужской фертильности (Bronet et al., 2012; Borini et al., 2006). По данным литературы, критический возраст мужчины может быть рассмотрен в диапазоне от 35 до 54 лет (Schlegel, Paduch, 2005; Seli, Sakkas, 2005; Oleszczuk et al., 2011). Исследование содержания сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, является актуальным при лечении мужского бесплодия, несмотря на то, что сперматозоиды даже со значительным уровнем повреждений ДНК сохраняют способность оплодотворять ооциты, поскольку при дальнейшем эмбриональном развитии оно может быть заблокировано на разных этапах. Многие авторы показывают, что фрагментация ДНК

не оказывает влияния на оплодотворение, но имеет важное значение для формирования бластоцист и имплантации (Simon et al., 2010). В связи с этим проведенная работа подтверждает необходимость исследования уровня анеуплоидий и нарушений целостности ДНК сперматозоидов у мужчин со сниженной репродуктивной функцией при обследовании перед проведением программы ЭКО.

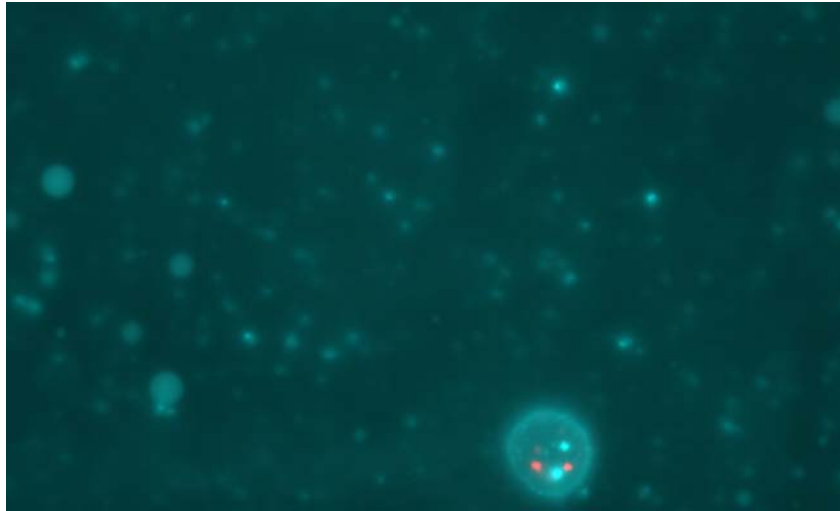


Рис. 3. Ядро анеуплоидного сперматозоида: красные сигналы – хромосомы 21, голубые сигналы – хромосомы 16

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. /Vorobyeva O.A., Voskresenskaya A.V., Odintsov A.A., Filatov M.V. Muzhskoye besplodiye i narusheniye strukturnoy organizatsii khromatina spermatozoidov. Sushchestvuyet li svyaz'? // Problemy reproduksii. – 2005. – №6. – S. 56–62./
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 460с. /Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. – M.: 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 reproduktivnoy sistemy // Vest RAMN. – 2000. – №5. – S. 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.
- Borini A., Tarozzi N., Bizzaro D. et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART // Hum Reprod. – 2006. – Vol.21, №11. – P. 2876–2881.
- Bronet F., Martinez E., Gaytan M. et al. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients // Hum. Reprod. – 2012. – Vol.27, №7. – P. 1922–1929.
- 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.
- Dohle G.R., Diemer T., Giwercman A. et al. Мужское бесплодие (научное редактирование: Акопян А.С.). – Европейская ассоциация урологов, 2010. – 67с.
- 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, Guoning 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.
- Muratori M., Marchiani S., Tamburrino L. et al. Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol.23, №5. – P. 1035–1043.
- 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.
- Oleszczuk K., Giwercman A., Bungum M. Intra-individual variation of the sperm chromatin structure assay DNA fragmentation index in men from infertile couples // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol.26, №12. – P. 3244–3248.
- 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.
- Simon L., Brunborg G., Stevenson M. et al. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome // *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol.25, №7. – P. 1594–1608.
- Speyer B.E., Pizzey A.R., Ranieri M. et al. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation // *Hum. Reprod.* – 2012. – Vol.25, №7. – P. 1609–1618.
- 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.Б.Лиманська / Presented by: O.B.Limanskaya
Рецензент: Н.В.Багацька / Reviewer: N.V.Bagatskaya
Подано до редакції / Received: 15.02.2013