

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ НАРУШЕНИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА У МУЖЧИН СО СНИЖЕННОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИЕЙ

Классический анализ спермы не всегда позволяет выявить отцовский эффект, обуславливающий нарушения эмбрионального развития [1–3]. Причинами нарушений сперматогенеза могут быть такие генетические факторы, как генные мутации, микроделеции, анеуплоидии, повреждения ДНК и нарушения компактизации хроматина [3–5]. Фрагментация ДНК сперматозоидов – относительно недавно открытая предположительная причина мужского бесплодия, которая интенсивно исследуется в последнее десятилетие [6–10]. В то же время данные о возможном влиянии фрагментации ДНК сперматозоидов на ранние этапы эмбрионального развития, процесс формирования бластоцист, на повышенный риск замирания беременности на раннем сроке и частоту спонтанных абортотворческих противоречивы [10, 11]. Причинами разрывов ДНК считают процессы изменения структуры хроматина в ходе сперматогенеза и апоптоз [12, 13].

Предполагается, что апоптоз служит конечным результатом различных патологических состояний и системой деградации, контролирующей сперматогенез [14–16]. Аномалии хроматина сперматозоидов часто ассоциированы с низкими показателями спермограммы, однако многие исследователи констатируют, что параметры фрагментации не имеют четкой корреляции с параметрами спермы, рекомендованными к исследованию ВОЗ (концентрацией, подвижностью, морфологией) [7–10]. В то же время в ряде исследований найдена отрицательная корреляция показателей фрагментации ДНК с параметрами спермограммы: концентрацией, подвижностью и долей морфологически аномальных сперматозоидов [11–13]. Спорным также остается вопрос о зависимости степени фрагментации ДНК от возраста пациента [12–16].

В связи с вышеизложенным целью данной работы стало исследование связи показателей фрагментации ДНК спермы с классическими параметрами спермограммы, с количеством незрелых сперматозоидов в эякуляте, зависи-

мость уровня фрагментации ДНК от возраста мужчины, а также анализ связи между наличием анеуплоидий в ядрах мужских гамет и количеством незрелых сперматозоидов у мужчин со сниженной репродуктивной функцией.

Материалы и методы

В ходе эксперимента было сформировано 3 группы пациентов. В группе 1 (n = 32, средний возраст $39,97 \pm 6,38$ лет), была исследована связь между уровнем анеуплоидных сперматозоидов и количеством незрелых сперматозоидов в эякуляте. Для пациентов группы 2 (n = 40, средний возраст $39,31 \pm 7,67$ лет), была исследована корреляция уровня фрагментации ДНК спермы с классическими параметрами спермограммы (подвижность и концентрация сперматозоидов, количество морфологически нормальных форм в эякуляте), а также зависимость уровня фрагментации ДНК спермы от возраста пациента. Для группы 3 (n = 70, средний возраст $39,53 \pm 6,88$ лет) была исследована связь между уровнем фрагментации ДНК спермы и количеством незрелых сперматозоидов в эякуляте.

Для анализа фрагментации ДНК сперматозоидов использован метод SCD (sperm chromatin dispersion) (HaloSperm, Halotech, Испания) [17–20]. Анализ проведен с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse 80i. Исследование степени зрелости сперматозоида основано на селекции сперматозоидов по степени связывания с гиалуроновой кислотой (hyaluron binding assay, НВА-тест) [21–24]. Для определения содержания зрелых сперматозоидов в эякуляте были использованы наборы компании Biocoat Incorporation (США). Исследование анеуплоидий в ядрах сперматозоидов проведено методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [25–27]. 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 каждого пациента было оценено не менее 400 ядер сперматозоидов.

Данные проверены на соответствие закону нормального распределения. Исследование связей между признаками проводилось с помощью корреляционного анализа по Спирмену [27]. Расчёты выполнены в программе Statistica-6.

Результаты и обсуждение

В результате эксперимента выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и такими параметрами классического анализа спермы, как подвижность ($r_s = -0,33 \pm 0,046$, $p < 0,05$) и количество морфологически нормальных форм ($r_s = -0,42 \pm 0,054$, $p < 0,05$). Полученные показатели имеют важное клиническое значение, учитывая неоднозначность результатов проведенных ранее исследований [22]. Данные об объекте и зависимость параметров спермограммы от уровня фрагментации ДНК спермы представлены в таблице 1.

В результате проведенного исследования показана положительная корреляция между уровнем фрагментацией ДНК сперматозоидов и возрастом мужчин для возрастной группы старше 30 лет ($r_s = 0,40 \pm 0,058$, $p < 0,05$). Для группы мужчин младше 30 лет связь степени фрагментации ДНК и возраста не доказана (табл. 2). Полученные данные имеют важное

практическое значение, уточняя возрастные показатели, определяющие репродуктивный потенциал мужчин, так как, по данным литературы, критический возраст для мужской фертильности колеблется в диапазоне 35–68 лет [14–18].

Выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между количеством анеуплоидных по хромосоме 21 и количеством незрелых форм сперматозоидов в эякуляте у мужчин со сниженной репродуктивной функцией ($r_s = -0,38 \pm 0,058$, $p < 0,05$). При этом связь между уровнем анеуплоидных сперматозоидов по хромосомам 13, 16, 18, X, Y не доказана (табл. 3). Для пациентов третьей группы ($N = 70$) определена статистически значимая отрицательная корреляция между уровнем фрагментации ДНК спермы и количеством незрелых сперматозоидов в эякуляте ($r_s = -0,25 \pm 0,027$, $p < 0,05$).

Выводы

Показано связь возраста мужчины и нарушения упаковки хроматина в сперматозоидах. Доказана связь между уровнем фрагментации ДНК спермы и такими параметрами как подвижность и морфология сперматозоидов. Клинически значимым является возраст пациента старше 30 лет. Полученные результаты показывают необходимость исследования уровня фрагментации ДНК сперматозоидов у мужчин со сниженной репродуктивной функцией перед проведением программ ЭКО.

Таблица 1. Связь параметров спермограммы и уровня фрагментации ДНК спермы

Параметры спермограммы		Фрагментация ДНК, %	r_s	$r_{\text{крит.}}$	p
Подвижность, %	$53,40 \pm 9,58$	$16,38 \pm 10,61$	-0,33	0,31	$p < 0,05$
Концентрация, $\times 10^6$, / мл	$60,49 \pm 34,66$	$16,38 \pm 10,61$	-0,26	0,31	$p > 0,05$
Нормальная морфология, %	$46,20 \pm 12,68$	$16,38 \pm 10,61$	-0,42	0,31	$p < 0,05$

Примечание: p – уровень значимости, r_s – коэффициент корреляции Спирмена.

Таблица 2. Зависимость уровня фрагментации ДНК спермы от возраста пациентов

Возраст	N	Фрагментация ДНК, %	Средний возраст, лет	r_s	$r_{\text{крит.}}$	p
Менее 30 лет	8	$14,65 \pm 11,51$	$28,38 \pm 0,63$	-0,29	0,72	$p > 0,05$
Более 30 лет	32	$16,81 \pm 10,44$	$41,84 \pm 6,66$	0,40	0,36	$p < 0,05$
Общая группа	40	$16,38 \pm 10,61$	$39,31 \pm 7,67$	0,31	0,31	$p > 0,05$

Примечание: p – уровень значимости, r_s – коэффициент корреляции Спирмена.

Таблица 3. Частота анеуплоидий спермы с учетом количества незрелых сперматозоидов в эякуляте

Хромосома	Анеуплоидии, ср.значение, %	Количество зрелых форм, ср.значение, %	r_s	$r_{критич.}$	p
13	2,56 ± 2,07	75,65 ± 15,78	-0,06	0,36	$p > 0,05$
16	0,55 ± 0,23	75,65 ± 15,78	-0,02	0,36	$p > 0,05$
18	0,78 ± 0,48	75,65 ± 15,78	-0,07	0,36	$p > 0,05$
21	0,97 ± 0,39	75,65 ± 15,78	-0,38	0,36	$p < 0,05$
X, Y	1,25 ± 0,40	75,65 ± 15,78	0,15	0,36	$p > 0,05$

Примечание: p – уровень значимости, r_s – коэффициент Спирмена.

Литература

1. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия (теоретические и практические подходы): Руководство для врачей / Под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова. – 2-е изд., доп. – М.: Медицинскоу информационное агентство, 2004. – 782 с.
2. 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.
3. Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Сорокина Т.М., Гришина Е.М. Структура наследственных нарушений репродуктивной системы // Вест РАМН. – 2000. – № 5. – С. 32–36
4. Agarwal A., Said T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility // Hum Reprod. – 2003. – 19, N 4. – P. 331–345.
5. Alan R. Thornhill, Karen S. Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis // J. of Molecul. Diagnosis. – 2002. – 4, N 1. – P. 11–29.
6. Benchaib M., Braun V., Lornage J. et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique // Hum. Reprod. – 2003. – 18, N 5. – P. 1023–1028.
7. 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. – 21, N 3. – P. 683–685.
8. 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. – 19, N 6. – P. 671–682.
9. Cayli S., Sakkas D., Vigue L., Demir R., Huszar G. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatin kinase, caspase-3 and Bcl_{XL} levels in mature and diminished maturity sperm // Mol. Hum. Reprod. – 2004. – 10, N 5. – P. 365–372.
10. Dohle G.R., Diemer T., Giwercm A., Jungwirth A., Kopa Z., Krausz C. Мужское бесплодие (научное редактирование: Акопян А.С.) // Европейская ассоциация урологов. – 2010. – 67 с.
11. Findikli N., Kahraman S., Kumtepe Y. Assessment of DNA fragmentation and aneuploidy on poor quality human embryos // Reprod Biomed Online. – 2004. – 8, N 2. – P. 196–206.
12. Henkel R., Kierspel E., Hajimohammad M. et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology // Reprod Biomed Online. – 2003. – N 7. – P. 477–484.
13. 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. – 21, N 6. – P. 1545–1550.
14. 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. – N 13. – P. 2161–2164.
15. Schlegel P.N., Paduch D.A. Yet another test of sperm chromatin structure // Fertil Steril. – 2005. – 84, N 4. – P. 854–859.
16. Seli E., Sakkas D. Spermatozoa nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART // Hum Reprod Update. – 2005. – 11, N 4. – P. 337–349.
17. Tesarik J., Mendoza C., Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI // Hum Reprod. – 2002. – N 17. – P. 184–189.
18. Mehdi Benchaib, ValeArie Braun, Jacqueline Lornage, Samia Hadj et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique // Hum Reprod. – 2003. – 18. – N 5. – P. 1023–1028.
19. M. Muratori, S. Marchiani, L. Tamburrino, V. Tocci, P. Failli, G. Forti, E. Baldi Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters // Hum Reprod. – 2008. – 23, N 5. – P. 1035–1043.
20. Luke Simon, Gunnar Brunborg, Michael Stevenson, Deborah Lutton et al. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome // Hum Reprod. – 2010. – 25, N 7. – P. 1594–1608.

21. 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. – 3, N 7. – P. 585–598.
22. Staessen C., Hortournaye H., Michiels A., Devroey P., Lierbaers I. PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients // *Human Reproduction*. – 2003. – 9, N 4. – P. 319–330.
23. Speyer B.E., Pizzey A.R., Ranieri M., Joshi R., Delhanty J.D.A., Serhal P. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation // *Hum Reprod*. – 2012. – 25, N 7. – P. 1609–1618.
24. Bronet F., Martorez E., Gaytarn M., Lin˜arn A., Cernuda D., Ariza M., Nogales 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. – 27, N 7. – P. 1922–1929.
25. Borini A., Tarozzi N., Bizzaro D., Bonu M.A., Fava L., Flamigni C., Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART // *Hum Reprod*. – 2006. – 21, N 11. – P. 2876–2881.
26. 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. – 26, N 12. – P. 3244–3248.
27. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 460 с.

ZHYLKOVA I.S.¹, FESKOV O.M.¹, BEZPECHNA I.M.¹, FEDOTA O.M.²

¹ *Center of Human Reproduction «Clinic of Professor Feskov O.M.»,
Ukraine, 61098, Kharkiv, Yelizarova str., 15, email: zhilkova@mail.ru*

² *Karazin's Kharkiv National University,
Ukraine, 61000, Kharkiv, Svobody Square, 4*

GENETIC FACTORS OF SPERMATOGENESIS FAILURES IN MEN WITH LOW REPRODUCTIVE FUNCTION

Aims. The correlation of DNA fragmentation level with classic sperm parameters, the male age and the level of immature spermatozoa and sperm aneuploidies was investigated. **Methods.** The level of the sperm DNA fragmentation was measured by the method of sperm chromatin dispersion. Semen aneuploidies were detected by the method of fluorescence in situ hybridization. The level of immature spermatozoa was measured by hyaluron binding assay. **Results.** There is a negative correlation between the DNA fragmentation level and sperm motility and sperm morphology. The significant negative correlation between DNA fragmentation level and immature spermatozoa level is proved. There is a negative correlation between the levels of DNA fragmentation and sperm aneuploidies. **Conclusions.** The failures of sperm DNA compactization influence on classic sperm parameters and correlates with the level of aneuploidies. There is a dependence of DNA fragmentation level on the male age. The critical clinically significant age for DNA fragmentation is 30 years old.

Key words: DNA fragmentation, aneuploidy, mature sperm, FISH.

УДК 616.379 – 008.64 – 053.2 / 5: 575

КОВАЛЕВА В.И., БУДРЕЙКО Е.А., ЧУМАК С.А.

ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН»,

Украина, 61153, г. Харьков, пр. 50-летия ВЛКСМ, 52-А, e-mail:iozdp@iozdp.org.ua

ИММУНОЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕЙ, СТРАДАЮЩИХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ I ТИПА

Согласно определению экспертов ВОЗ, сахарный диабет (СД) является на сегодняшний день неинфекционной эпидемией. Если вначале 80-х годов прошлого века число больных СД было примерно 30 млн., то сегодня оно достигло более 366 млн., а по прогнозам экспертов Международной диабетической федерации и ВОЗ к 2030 году ожидается более 522 млн. [1]. Численность случаев СД I типа, что регистри-

руется ежегодно в мире, составляет 218000 лиц, ежегодный прирост заболеваемости детей равняется 3 % [2].

За последние два десятилетия достигнут некоторый прогресс в исследованиях генетических основ сахарного диабета. Так, сканирование выявило наличие различных хромосомных областей связанных с развитием сахарного диабета. Согласно генетической этиологии все