

И.Л. Некрасова, В.Г. Шестакова, А.Г. Иванов, А.А. Артамонов
ИССЛЕДОВАНИЕ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ

ГБОУ ВПО Тверской ГМУ Минздрава России

Статья представляет результаты изучения фрагментации ДНК сперматозоидов в гистологических образцах спермы с выделением разных типов по степени выраженности изменений для расширения возможностей диагностики причин мужского бесплодия.

Ключевые слова: *репродукция, мужское бесплодие, сперматозоиды, фрагментация ДНК, «хало».*

SPERM DNA FRAGMENTATION RESEARCH
I.L. Nekrasova, V.G. Shestakova, A.G. Ivanov, A.A. Artamonov

Tver State Medical University

The article presents the results of sperm DNA fragmentation research in the histological samples of semen with the release of different types according to severity of changes for empowering diagnosis of male infertility.

Key words: *reproduction, male infertility, sperm, DNA fragmentation, «halo».*

Введение

В последнее десятилетие нарушение репродуктивной функции мужчин, являясь весьма актуальной проблемой, приобрело особую медицинскую и социальную значимость. Так, исследования последних лет доказали, что с мужским фактором связано до 40-50% причин бесплодия, при том, что на протяжении многих лет бесплодие в большинстве своем связывалось с проблемами в репродуктивной системе женщины. Так, в 30-50% случаев мужское бесплодие обусловлено множеством причинных факторов, вызывающих изменение числа сперматозоидов, их морфологию, функциональную активность и генетические характеристики. Следует отметить, что бесплодие у мужчин может протекать и с нормоспермией, в то же время фертильность бывает сохранена при некоторых отклонениях показателей спермограммы.

В связи с этим для диагностики особенностей мужского бесплодия ВОЗ объединила в единый протокол несколько серий лабораторных методик, направленных на стандартизацию исследования качества спермы в разных странах. Эти исследования предполагают измерение концентрации, морфологии и подвижности сперматозоидов, дополненное проведением определенных функциональных тестов и определением биохимических и ферментативных параметров спермы (ВОЗ, 1999). Указанный диагностический набор позволяет определить общий объем спермы и концентрацию сперматозоидов на миллилитр ее объема, а также установить связь бесплодия мужчины с

отсутствием (азооспермия) или значительным снижением (олигоспермия) количества сперматозоидов в эякуляте. Кроме того, данный спектр тестов делает возможным выявление проблем, связанных с подвижностью сперматозоидов (астенозооспермия), что затрудняет их продвижение через полость матки и успешное достижение внешней трети фаллопиевых труб. Данные методики позволяют проанализировать наличие серьезных морфологических изменений структуры сперматозоидов (головки, шейки, хвостика) по типу тератозооспермии и их связь с нарушением способности эффективно оплодотворять яйцеклетку.

Несмотря на использование в полном объеме клинических и лабораторных исследований, у 30-50% бесплодных мужчин причину бесплодия установить не удавалось, эти случаи оценивались как идиопатическое бесплодие. Было выяснено, что в его основе может лежать повреждение ДНК сперматозоидов, что послужило предметом активных исследований факта фрагментации ДНК сперматозоидов. Аномалии хроматина или даже повреждения ядерной ДНК сперматозоидов могут иметь место или даже быть результатом нарушений в процессе укладки спирали ДНК, происходящем в ходе сперматогенеза. Также существует вероятность, что эти изменения могут быть результатом повреждений ДНК свободными радикалами, которые вызывают окислительный стресс, следствием чего может стать инициация процесса апоптоза.

Цель исследования

Оценить возможность изучения морфологическими методами наличия и выраженности фрагментации ДНК сперматозоидов в гистологических образцах спермы для расширения возможностей диагностики причин мужского бесплодия.

Материал и методы

Существуют различные методы для определения целостности хроматина и ДНК в сперматозоидах человека. В нашем исследовании использован тест «ХалоСперм» компании «Халотек» для определения наличия и выраженности фрагментации ДНК в сперматозоидах. Согласно утвержденной методике, сперматозоиды включаются в агарозный микрогель. Затем к суспензии сперматозоидов добавляется кислый денатурирующий раствор. Сперматозоиды, не имеющие разрывов в своей ДНК, устойчивы к кислотной денатурации и сохраняют двухцепочечную структуру ДНК. В сперматозоидах с фрагментированной ДНК в участках ее разрывов денатурация происходит спонтанно, и ДНК становится одноцепочечной. В дальнейшем образец обрабатывают лизирующим раствором для экстракции ядерных белков. Лизис позволяет достичь разворачивания нитей хроматина, лучшего сохранения морфологии головки и ядра и получения диспергированного ореола с большей плотностью материала хроматина

(«хало»), что способствует его интенсивному окрашиванию. Окрашивание производят по методике компании «Халотек» красителями теста «ХалоСперм». При интерпретации результатов исходят из того, что чем больше фрагментация ДНК в клетке, тем меньше вокруг этой клетки диспергированный ореол – «хало». Сперматозоиды с денатурированной ДНК подсчитываются количественно.

С помощью этого метода было установлено, что при наличии у пациента 30% или более сперматозоидов с фрагментированной ДНК вероятность наступления беременности снижается до 1% и менее, причем как при естественном, так и при искусственном оплодотворении. Доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК может быть относительно постоянной в различных циклах сперматогенеза данного индивидуума, но может и варьировать в зависимости от внешних факторов или, например, после сильных лихорадочных заболеваний, таких как грипп. При отборе проб спермы для последующего использования в процессе искусственного оплодотворения целесообразно проводить серии исследований для выявления образцов с наименьшим уровнем фрагментации ДНК. Необходимо иметь в виду, что замораживание образцов спермы в жидком азоте не изменяет уровня фрагментации ДНК, поэтому исследования можно проводить с замороженными образцами, с возможностью их дальнейшего использования для искусственного оплодотворения, оплодотворения *in vitro* или для введения сперматозоидов внутрь цитоплазмы яйцеклетки.

В нашем исследовании изучено 26 гистологических препаратов спермы, приготовленных по вышеописанной методике, под световым микроскопом с увеличением $\times 800$ и дальнейшей оценкой результатов.

Результаты и обсуждение

Оценка результатов проводилась визуально с подсчетом пяти типов сперматозоидов, классифицированных в зависимости от размеров «хало». Существуют две части генетического материала, соответствующего депротейнизированному ядру сперматозоида. Первая часть – это головка с располагающимся в центре ядром сперматозоида, вторая часть, локализованная по периферии – «хало», представляющее собой ДНК хроматиновой дисперсии.

При гистологическом исследовании микропрепаратов нами обнаружены сперматозоиды без фрагментации ДНК, подразделяющиеся на два вида. Первый вид представлен сперматозоидами с большим «хало», которое больше или равно диаметру головки (core) (тип 1 на рис. 1). Второй вид составили сперматозоиды со средним по размеру «хало», равным половине диаметра головки (тип 2).

Сперматозоиды с фрагментированной ДНК, структурно, в свою очередь, подразделяющиеся на три категории: сперматозоиды с малым «хало», без «хало» и деградированные клетки. Сперматозоиды с малым «хало» представляют собой клетки, «хало» которых меньше или равно трети диаметра головки (тип 3). Сперматозоиды без «хало» не имеют хроматиновой дисперсии по периферии головки (тип 4). Деградированные сперматозоиды, у которых «хало» отсутствует, а головка имеет необычную форму или окрашена слабо (тип 5). После идентификации типов сперматозоидов в препарате высчитывалось количество сперматозоидов каждого вида для каждого препарата и их среднее количество.

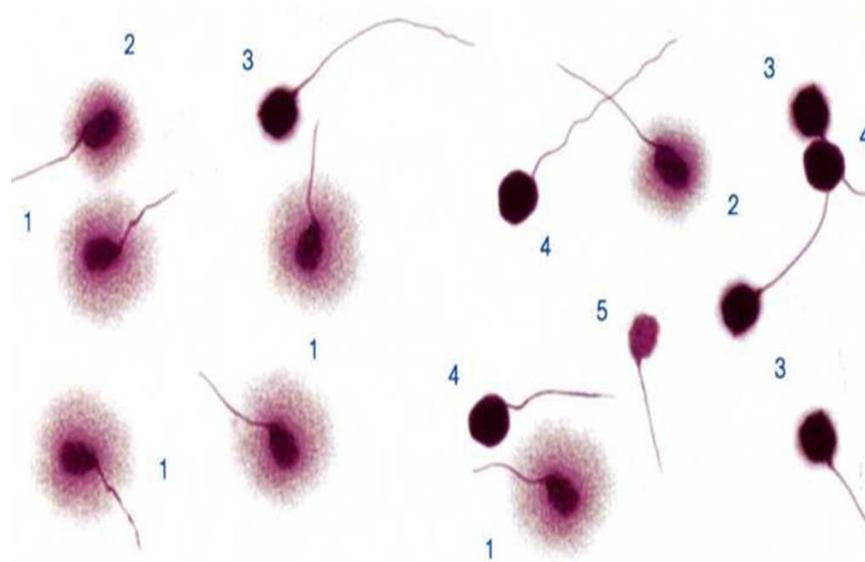


Рис. 1. Микрофотография препарата сперматозоидов: увеличение $\times 800$, окраска по методике компании «Халотек» красителями теста «ХалоСперм».

Среди 150 обратившихся пациентов с бесплодием (статистика предоставлена нам ООО «КДФ») при изучении индекса фрагментации ДНК сперматозоидов (ИФ), величина ИФ ниже 20% составила 49,3%; 20-29% – 26,7%; 30% и более – 24,0% (рис. 2).

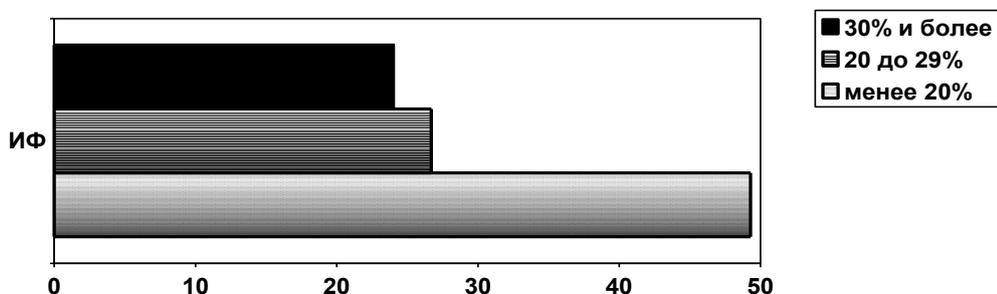


Рис. 2. Частота встречаемости различных индексов фрагментации ДНК сперматозоидов среди обратившихся в ООО «КДФ».

Заключение

При морфологическом изучении наличия и выраженности фрагментации ДНК сперматозоидов в гистологических образцах спермы установлено, что наиболее часто встречались сперматозоиды со средним и большим «хало», вторыми по частоте – клетки с малым «хало», реже – сперматозоиды без «хало» и деградированные сперматозоиды, что соответствует статистическим данным ООО «КДФ» и не противоречит российским статистическим показателям. Применение данного метода расширяет диагностические возможности определения причин мужского бесплодия.

Литература/References

1. Botros R., Garcia-Velasco J.A., Sallah H., Marringiannaris A. Infertility and Assisted Reproduction. Cambridge: Academia, 2008. – 806 p.
2. Ярман В.В., Шпилея Е.С., Михайличенко В.В. Значение индексов и типов половой конституции для прогнозирования динамики изменения показателей спермограммы у мужчин в бесплодном браке // Андрология и генитальная хирургия. – 2009. – № 1. – С. 54-57.
3. Роживанов Р.В., Парфенов Н.С., Курбатов Д.Г. Лечение олигоспермии у мужчин с бесплодием // Проблемы репродукции. – 2010. – Т. 56, № 1. – С. 31-34.
4. Макарова Н.П. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Изд. 5-е: пер. с англ. / Под ред. Л.Ф. Курило. М.: Капитал принт, 2012. – 291 с.
5. Калинин С.Ю. Практическая андрология. / Под ред. С.Ю. Калинин. М.: Медицина, 2009. – 250 с.
6. Денисенко С.В., Дарий А.С., Кононенко М.И., Зерова-Любимова Т.Э. Генетика репродукции. К.: Ферзь-ТА, 2008. – 652 с.
7. Попов Н.С., Демидова М.А., Шестакова В.Г., Елисеева Т.И., Казаишвили Ю.Г. Морфологические изменения в коже крыс при наружном применении экстракта пиявки медицинской при термическом ожоге // Верхневолжский медицинский журнал. - 2014. - № 2. - С. 45-50.
8. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Курицын В.М., Шестакова В.Г., Павлова Н.В. Использование лактобацилл в лечении сальмонеллезного гастроэнтерита в эксперименте на животных // Верхневолжский медицинский журнал. - 2013. - Т. 11. - № 2. - С. 21-26.
9. Павлова Н.В., Харитоновна Е.А., Шестакова В.Г. Цито-и гистоструктура регенерата кожи в условиях экспериментальной аппендэктомии // Морфология. - 2009. - Т. 136. - № 4. - С. 110.

10. Харитоновна Е.А., Шестакова В.Г., Павлова Н.В. Изменение уровня содержания фосфоинозитидов на фоне макрофагической фазы воспаления в условиях стимуляции заживления ран кожи в эксперименте // Морфология. - 2008. - Т. 133. - № 2. - С. 144.
11. Харитоновна Е.А., Шестакова В.Г., Павлова Н.В. Изменение содержания фосфатидилинозитидов в макрофагической фазе воспаления в условиях стимуляции заживления ран кожи в эксперименте // Морфология. - 2008. - Т. 133. - № 2. - С. 144б.
12. Хомулло Г.В., Петрова М.Б., Павлова Н.В., Шестакова В.Г. Морфофункциональные аспекты заживления ран кожи в условиях стимуляции // Морфология. - 1996. - № 2. - С. 101.