

УДК 616.6

М.К. АЛЧИНБАЕВ, А.Н. АРАЛБАЕВА, Л.Н. ТУЛЕЕВА, С.М. ДУЙСЕНБАЕВА, З.М. МУХАМЕДЖАНОВА

Научный центр урологии имени акад. Б.У. Джарбусынова, г. Алматы, Казахстан

ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ МУЖЧИН С БЕСПЛОДИЕМ

Исследование проведено в рамках грантового финансирования научного проекта Министерства образования и науки Республики Казахстан на тему «Разработка научно обоснованных методов диагностики и лечения генетически обусловленных нарушений репродуктивной функции у мужчин»



Алчинбаев М.К.

Проблема бесплодия остается одной из актуальных в современной медицине, так как частота бесплодного брака составляет 15–16% в общей популяции супружеских пар. Этот показатель продолжает расти, и приблизительно в 40-50% случаев основная роль отводится мужскому фактору.

Цель исследования. Определить хромосомные aberrации, фрагментации ДНК и нарушения сперматогенеза у мужчин с бесплодием.

Материал и методы. Исследованы образцы спермы 58 мужчин с бесплодием и 23 условно здоровых фертильных мужчин.

Фрагментацию ДНК спермы исследовали методом SCD (spermchromatindispersion, Spermprocessor, India).

Для исследования хромосомных аномалий в ядрах сперматозоидов по X, V, XVIII и XXI хромосомам применяли метод флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием флуоресцентных ДНК-зондов (VysisMultiVysionPGT, AbbotMolecular). Оценку проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope 40.

Результаты и обсуждение. Проведено исследование эякулята 81 мужчины, из которых у 58 (71,6%) мужчин было выявлено бесплодие, и 23 (28,4%) условно здоровых фертильных мужчин.

Выявлено, что при развитии патозооспермии нарушена целостность генетической информации сперматозоидов, проявляющаяся в виде фрагментации ДНК, и нарушены сеерегации хромосомом в мейозе.

Установлено, что преобладающим вариантом патозооспермии у мужчин с бесплодием является олигозооспермия и в данной группе пациентов отмечена большая частота количественных нарушений набора хромосомом.

Выводы. Полученные результаты показывают значительное увеличение случаев изменений на молекулярно-генетическом уровне, а именно – нарушения целостности генетического материала и изменения в количестве хромосомом в ядрах сперматозоидов у пациентов с бесплодием, что не может не сказаться на течении процесса сперматогенеза, обуславливающего проявление мужского бесплодия.

Ключевые слова: патозооспермия, бесплодие, фрагментация ДНК, анеуплоидия ядер сперматозоидов.

Проблема бесплодия остается одной из актуальных современной медицины, так как частота бесплодного брака составляет 15–16% в общей популяции супружеских пар [1]. Этот показатель продолжает расти, и приблизительно в 40-50% случаев основная роль отводится мужскому фактору [2]. Нарушение репродуктивной функции у мужчин нередко связано с изменениями выработки спермы, подвижности или функционирования сперматозоидов, а также нарушениями, связанными с их транспортом. Приблизительно у половины мужчин с нарушениями выработки спермы не удается установить причину бесплодия [3].

Известно, что определенную роль при мужском бесплодии играет наличие хромосомных аномалий, которые выявить при стандартных диагностических методах анализа спермы не представляется возможным [4, 5]. С развитием

цитогенетических методов, в частности метода флуоресцентной гибридизации (FISH), появилась возможность исследовать связь между проявлениями патозооспермии и хромосомных анеуплоидий в ядрах сперматозоидов человека [6, 7]. Выявлено, что среди мужчин с бесплодием и нарушением сперматогенеза у 5-15% обнаруживают хромосомные нарушения, аномалии гоносомом составляют 75%, аутосомом – 25% [8].

Цель исследований – определить хромосомные aberrации, фрагментации ДНК и нарушения сперматогенеза у мужчин с бесплодием.

Материал и методы

Исследованы образцы спермы 58 мужчин с бесплодием и 23 условно здоровых фертильных мужчин. Всеми пациентами подписано согласие на добровольное участие в исследованиях. Возраст обследованных пациентов

Контакты: Тулеева Лаззат Наматуллаевна, зав. отделом менеджмента НЦУ им. Б.У. Джарбусынова, г. Алматы. Тел. +7 705 232 14 55, +7 747 284 84 15 e-mail: lazzattul@mail.ru

Contacts: Lazzat Namatullaeva Tuleyeva, manager of department of management Research Centre of Urology named after B.U. Djarbusynov, Almaty c., Ph. +7 705 232 14 55, +7 747 284 84 15 e-mail: lazzattul@mail.ru

варьировал от 28 до 45 лет и в среднем составил в основной группе $33,06 \pm 0,44$ года, в контрольной группе – $32,30 \pm 1,11$ года ($p > 0,05$).

В ходе исследования проводили анализы спермы на подвижность, концентрацию и морфологию по строгим критериям Крюгера (ВОЗ, 2010). Для сбора спермы пациент должен был воздержаться не менее 3 дней и получить сперму путем мастурбации. Образец спермы помещали в термостат для полного разжижения, отмечалось время разжижения. Оценку параметров спермы, таких как подвижность, концентрация и морфология, проводили с помощью автоматической программы «Видео-тест сперм 3.2» производства ООО «Видео-тест», г. Санкт-Петербург, Россия. Для этого 10-20 мкл разжиженной спермы загружали в камеру Маклера, покрывали стеклом и анализировали при увеличении $\times 20$. Морфологию сперматозоидов проводили на обработанных отмытых сперматозоидах, окрашенных по методу Diff-Quick. С помощью автоматической программы производили расчет соотношения

сперматозоидов, принадлежащих к классам «норма» и «патология», процентного соотношения дефектов головы, шеи и хвоста и автоматический расчет индекса аномалий МАИ (индекс множественных аномалий), TZI (индекс тератозооспермии), SDI (индекс деформации спермы).

Фрагментация ДНК спермы исследовали методом SCD (spermchromatin dispersion, Spermprocessor, India) с использованием флуоресцентного микроскопа Axioscope 40. Расчет индекса фрагментации ДНК проводили в 500 клетках.

Для исследования хромосомных аномалий в ядрах сперматозоидов по X, V, XVIII и XXI хромосомам применяли метод флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием флуоресцентных ДНК-зондов (VysisMulti Vysion PGT, Abbot Molecular). Оценку проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope 40.

Статистическая обработка данных проводилась с учетом критерия Фишера-Стьюдента при помощи программы GraphPadPrism 6.0 (GraphPadSoftWare, SanDiego, CA). Результаты считались достоверными при значении $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведено исследование эякулята 81 мужчины, из которых у 58 (71,6%) мужчин было выявлено бесплодие, и 23 (28,4%) условно здоровых фертильных мужчин. На

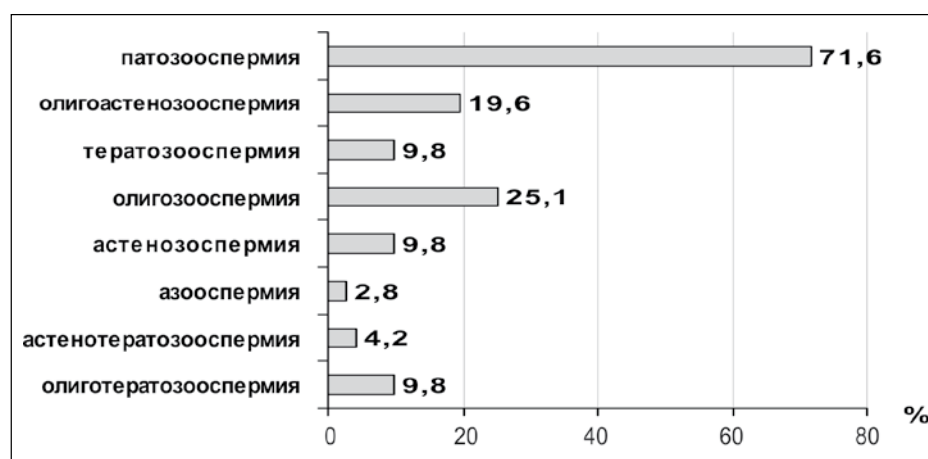


Рисунок 1 – Показатели спермограмм мужчин с бесплодием

Таблица 1 – Индексы множественных аномалий и дефекта спермы при патологии сперматозоидов

Разновидность патозооспермии	Индекс множественных аномалий, референсные значения менее 1,6	Индекс дефекта сперматозоидов, референсные значения менее 1,6
Астенозооспермия	$1,5 \pm 0,58^*$	$1,58 \pm 0,5^{**}$
Олигозооспермия	$1,43 \pm 0,2^{**}$	$1,25 \pm 0,14^{**}$
Тератозооспермия	$2,82 \pm 0,4^*$	$1,95 \pm 0,16^*$
Олигоастенозооспермия	$1,0 \pm 0,38^{***}$	$0,8 \pm 0,23^*$
Олиготератозооспермия	$1,92 \pm 0,29^*$	$2,5 \pm 0,38^{**}$
Астенотератозооспермия	$2,0 \pm 0,18^*$	$1,9 \pm 0,17^*$
Нормозооспермия	$0,3 \pm 0,15^*$	$0,5 \pm 0,08^{**}$

Данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,001$

рисунке 1 приведены результаты анализа спермограмм мужчин с бесплодием.

Как видно из рисунка, у всех мужчин с бесплодием (71,6%) выявлены различные виды патозооспермии: азооспермия в 2,8%, астенотератозооспермия в 4,2%, олиготератозооспермия, тератозооспермия и астенозооспермия в 9,8%, олигоастенозооспермия в 19,6% и олигозооспермия в 25,1% случаев.

Анализ индекса множественных аномалий (ИМА) и индекса дефекта спермы (ИДС) показал (табл. 1), что при таких видах патологии, как астенозооспермия, олигозооспермия и олигоастенозооспермия, индексы, характеризующие степень аномалии в морфологии сперматозоидов, не превышают рекомендуемых величин, тогда как при тератозооспермии, олиготератозооспермии и астенотератозооспермии значения данных индексов превышали референсные значения практически в 1,5 раза.

При исследовании препаратов клеток на наличие фрагментаций ДНК ядер выявлено, что большая степень фрагментации отмечается при астенозооспермии $46,0\% \pm 5,3$ ($p = 0,01$), при астенотератозооспермии уровень фрагментации составил $45,2\% \pm 7,2$ ($p = 0,009$) и при олигоастенозооспермии – $42,1\% \pm 8,5$ ($p = 0,003$).

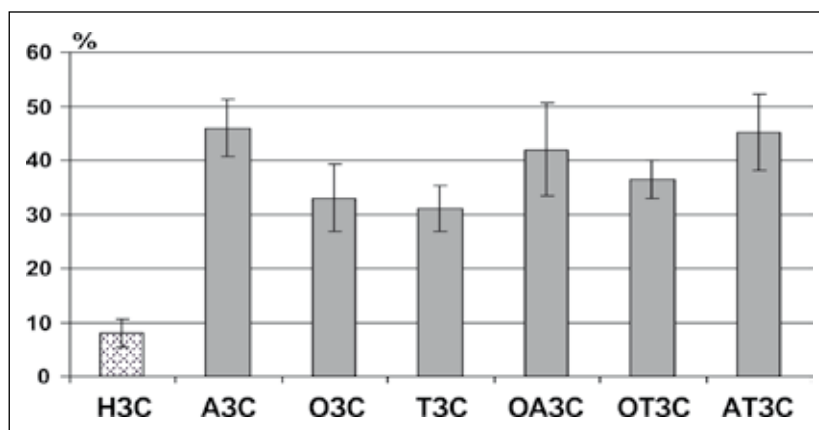


Рисунок 2 – Степень фрагментации ДНК ядер сперматозоидов при патоспермии
По оси абсцисс: степень фрагментации (%), по оси ординат: группы пациентов – АЗС – астенозооспермия, ОЗС – олигозооспермия, ТЗС – тератозооспермия, ОАЗС – олигоастенозооспермия, ОТЗС – олиготератозооспермия, АТЗС – астентератозооспермия, НЗС – нормозооспермия

Таблица 2 – Частота и характер нарушений в наборе хромосом сперматозоидов у пациентов с бесплодием

Вариант патологии	Распределение хромосомных аномалий у пациентов с бесплодием, %					
	АЗС	ОЗС	ТЗС	ОАЗС	ОТЗС	АТЗС
Нулесомия X	0	5,4	1,8	3,6	0	0
Дисомия X	1,8	8,9	3,6	7,1	3,6	0
Нулесомия V	3,6	7,1	3,6	5,4	1,8	0
Дисомия V	1,8	1,8	3,6	3,6	1,8	0
Дисомия XVIII	3,6	3,6	0,0	1,8	1,8	3,6
Дисомия XXI	1,8	5,4	0,0	3,6	3,6	1,8

На рисунке 2 представлены данные по степени фрагментации ДНК ядер сперматозоидов при патоспермии.

Степень фрагментации ядерного ДНК сперматозоидов при олиготератозооспермии составила $36,5\% \pm 3,5$ ($p=0,007$), олигозооспермии $33\% \pm 6,2$ ($p=0,009$) и тератозооспермии $31\% \pm 4,2$ ($p=0,02$) (рис. 2). В группе здоровых пациентов степень фрагментации ДНК не превышала референсных значений (в норме до 15%) и составила $8\% \pm 2,5$ ($p=0,008$).

На следующем этапе исследования был проведен молекулярно-цитогенетический анализ методом флуоресцентной гибридизации, в результате которого выявлено, что средний уровень анеуплоидий у мужчин с нормозооспермией составил $0,11\% \pm 0,06$ ($p=0,003$), тогда как в случаях с патозооспермией значение названного показателя варьировало от 2,11 до 2,9% ($p=0,014$) при референсных значениях – до 0,25%.

При анализе числа хромосом в ядрах сперматозоидов у пациентов с различными видами патозооспермии выявлены аномалии набора хромосом в половых клетках. Большая доля хромосомных aberrаций при патозооспермии проявляется в виде дисомии хромосомы X и нулесомии хромосомы V, их частота составила 25% и 21,4% соответственно от общего количества нарушений в расхождении хромосом при патозооспермии. Аналогично частота про-

явления дисомии по V и XXI хромосомам составила 16,1% и 12,5%, тогда как количество обнаруженных нарушений числа хромосом, таких как дисомия по XVIII и нулесомия по X хромосомам, составляло 10,7% ($p=0,01$).

Детальный анализ частоты проявлений различных типов анеуплоидий сперматозоидов при патозооспермии показал, что различные виды хромосомных отклонений наиболее часто встречаются при олигозооспермии по сравнению с другими видами патозооспермии (табл. 2).

Выводы

Таким образом, полученные результаты показывают значительное увеличение случаев изменений на молекулярно-генетическом уровне, а именно – нарушения целостности генетического материала и изменения в количестве хромосом в ядрах сперматозоидов у пациентов с бесплодием, что не может не сказаться на течении процесса сперматогенеза, обуславливающего проявление мужского бесплодия. Генетическое обследование пациентов с нарушением репродуктивной функции приобретает определенное значение ввиду выявления у них достаточно высокой частоты генетических отклонений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Локшин В.Н. Организация специализированной помощи супружеским парам с бесплодием в Республике Казахстан // Материалы XX ежегодной международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» – Нижний Новгород, 2010.
- 2 Wang R.X., Fu C., et al. Male infertility in China: laboratory finding for AZF microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile men from Northeastern China // J Assist Reprod Genet. – 2010 Jul. – Vol. 27(7). – P. 391–396
- 3 Денисенко С.В., Дарий А.С. Кононенко М.И., Зерова-Любимова Т.Э. Генетика репродукции. – Киев: Ферзь-ТА, 2008. – 652 с.
- 4 Hwang K., Weedin J.W., Lamb D.J. The use of fluorescent *in situ* hybridization in male infertility // TherAdv Urol. – 2010 Aug. – Vol. 2(4). – P. 157–169
- 5 Ferlin A. Male infertility: role of genetic background // Reproductive BioMedicine. – 2007. – Vol 14, No 6. – P. 734–745
- 6 Shamsi M.B., Kumar K., Dada R. Genetic and epigenetic factors: Role in male infertility // Indian J Urol. – 2011 Jan-Mar. – Vol. 27(1). – P. 110–120
- 7 Jordan R., Edington J., Evans H.H., Schwartz J.L. Detection of chromosome aberrations by FISH as a function of cell division cycle (harlequin-FISH) // Biotechniques. – 1999 Mar. – Vol. 26 (3). – P. 532–4
- 8 Barakat A.I., Seikaly M.G., Kaloustian V.M. Urogenital abnormalities in genetic diseases // J of Urology. – 1986. – Vol.136(4). – P. 778–785

Т Ұ Ж Ы Р Ы М

**М.К. АЛШЫНБАЕВ, А.Н. АРАЛБАЕВА, Л.Н. ТӨЛЕЕВА,
С.М. ДҮЙСЕНБАЕВА, З.М. МҰХАМЕДЖАНОВА**

Б.О. Жарбосынов атындағы урология ғылыми орталығы, Алматы қ., Қазақстан

БЕДЕУ ЕРЛЕРДІҢ СПЕРМАТОЗОИД ДНҚ-СЫН ЗЕРТТЕУ

Қазіргі медицинада бедеулік мәселесі маңызды орында тұр, өйткені бедеу отбасылар саны жалпы популяцияда 15–16% жетті. Бұл көрсеткіштер тағы да ұлғаюда және 40–50% жағдайда негізгі орынды ерлер алып отыр.

Мақсаты. Бедеу ерлердің хромосомалық аберрациялары, сперматозоид ДНҚ фрагментациясын және сперматогенез бұзылыстарын зерттеу.

Материал және әдістері. 58 бедеу және 23 қалыпты ерлердің шәует үлгілері қаралды. Сперматозоид ДНҚ фрагментациясын SCD-әдісімен зерттедік (sperm chromatin dispersion, Spermprocessor, India).

Сперматозоид ядросындағы X, V, XVIII, XXI хромосомалық аномалияларды зерттеу үшін FISH әдісін пайдаландық (VysisMultiVysionPGT, AbbotMolecular).

Нәтижелері және талқылауы. 81 шәует үлгісі зерттелді, оның ішінде 58 (71,6%) бедеу және 23 (28,4%) қалыпты ерлер үлгісі.

Бедеу ерлер мен салауатты ерлер ұрықтарының үлгілері зерттелді. Барлық бедеу ерлерде әртүрлі патозооспермиялар анықталды. Сонымен қатар патозооспермиясы бар ерлерде сперматозоид үлгілерінің ДНҚ үзіндісі және мейоз кезінде хромосома сегрегациясының бұзылғандығы байқалып, генетикалық ақпараттың тұтастығы бұзылған деп анықталды. Ол ер бедеулігінің олигозооспермиясы бар ерлерде хромосома жиынтығының көптеген бұзылыстары басым болып шықты.

Қорытынды. Алынған нәтижелер молекулалық-генетикалық деңгейдегі өзгерістердің ұлғаюын, әсіресе генетикалық ақпараттың бұзылғандығын, дәлірек айтқанда ядродағы хромосома санының өзгеруін көрсетеді. Ол өзгерістер сперматогенез процесіне кері әсерін тигізуі ықтимал.

Негізгі сөздер: патозооспермия, бедеулік, ДНҚ фрагментациясы, сперматозоид ядро анеуплоидиясы.

SUMMARY

**M.F. ALCHINBAEV, L.N. TULEYEVA, S.M. DUISENBAEVA,
A.N. ARALBAEVA, Z.M. MUKHAMEDZHANOVA**

*Research center of urology n.a. Dzharbussynov B.U.,
Almaty c.*

STUDY DNA OF THE SPERM OF INFERTILE MEN

Infertility is one of the important modern medicine, since the frequency of infertile marriages is 15-16% of the general population of couples. This figure continues to grow and approximately 40-50% of cases the primary role for male factor.

The purpose of research – to determine the chromosomal aberrations, DNA fragmentation and disturbance of spermatogenesis in men with infertility.

Material and methods. Samples of semen 58 infertile men and 23 fertile men apparently healthy.

Sperm DNA fragmentation was examined by SCD (spermchromatindispersion, Spermprocessor, India).

For the study of chromosomal abnormalities in sperm for the nucleus X, V, XVIII and XXI chromosomes used the method of fluorescence insitu hybridization with fluorescent DNA probes (VysisMultiVysionPGT, AbbotMolecular). Evaluation was carried out using a fluorescence microscope Axioscope 40.

Results and discussion. A study of 81 men ejaculate out of which 58 (71.6%) were male infertility and found 23 (28.4%) of healthy fertile men.

It was revealed that during the development of pathozoosperm violated the integrity of the genetic information of sperm, which is manifested in the form of DNA fragmentation and broken chromosome segregation in meiosis.

It was established that the predominant option pathosperm male infertility is oligozoospermia in this group of patients noted a higher rate of violations of quantitative sets of chromosomes.

Conclusion. The results show a significant increase in cases of changes on the molecular-genetic level – namely, violation of the integrity of the genetic material and changes in the number of chromosomes in sperm nuclei of patients with infertility, which can not affect the course of the process of spermatogenesis, causes expression of male infertility.

Key words: pathozoosperm, infertility, DNA fragmentation, sperm aneuploidy of the nuclei.

Для ссылки: Алчинбаев М.К., Аралбаева А.Н., Тулеева Л.Н., Дүйсенбаева С.М., Мухамеджанова З.М. Исследование ДНК сперматозоидов мужчин с бесплодием // J. Medicine (Almaty). – 2015. – No 7 (157). – P. 30-33

Статья поступила в редакцию 13.07.2015 г.

Статья принята в печать 17.07.2015 г.