

Резюме

**КОРРЕКЦИЯ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЙ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-НАДПОЧЕЧНИКОВОЙ СИСТЕМЫ МУЛЬТИПРОБИОТИКОМ «СИМБИТЕР»**

**Фалалеева Т.М., Вирченко А.В., Янковский Д.С., Береговая Т.В.**

Установлено, что мультипробиотик «Симбистер ацидофильный концентрированный» восстанавливает функционирование гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, которое нарушается под воздействием чрезмерного стресса. Это создает благоприятные условия для заживления стресс-индуцированных поражений в слизистой оболочке желудка крыс. Воздействие мультипробиотика на стресс-систему осуществляется благодаря его иммуномодулирующим свойствам: его введение снижает уровень интерлейкина-1 $\beta$  в сыворотке крови крыс, который возрастает в условиях действия стресса.

**Ключевые слова:** стресс, мультипробиотик, адренокортикотропный гормон, кортизол, интерлейкин-1 $\beta$ .

Статья надійшла 22.11.2011 р.

**CORRECTION OF STRESS-INDUCED DISORDERS OF THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL SYSTEM WITH MULTIPROBIOTIC "SYMBITER"**

**Falaleeva T.M., Virchenko O.V., Yankovski D.S., Beregovaya T.V.**

The excessive stress causes disorders of the hypothalamic-pituitary-adrenal system. It was established that multiprobiotic "Symbiter acidophilic concentrated" restores the functioning of this system, therefore provides favorable conditions for healing of stress-induced lesions in gastric mucosa of rats. Multiprobiotic influence on the stress-system is realised due to its immunomodulatory properties: it reduces the level of interleukin-1 $\beta$  in serum of rat blood, which is increasing in terms of stress.

**Key words:** stress, multiprobiotic, adrenocorticotrophic hormone, cortisol, interleukin-1 $\beta$ .

УДК 573.6:577.21-076

**Феськов А.М., Феськова И.А., Жилкова Е.С., Чумакова И.А., Сомова Е.В.  
Клиника профессора Феськова А.М., «Центр Репродукции Человека», г. Харьков**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ У МУЖЧИН С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ НЕЗРЕЛЫХ СПЕРМИЕВ В ЭЯКУЛЯТЕ**

Исследована связь между повышенным содержанием незрелых форм спермиев и сперматозоидов с фрагментированной ДНК в эякуляте у мужчин с астено-, олиго- и тератозооспермией. Корреляция между результатами НВА-теста и анализа фрагментации ДНК сперматозоидов установлена в 80,0 % случаев. Содержание спермиев с поврежденной ДНК значительно ( $p < 0,05$ ) выше у пациентов с показателями спермограммы, отличными от нормы, в сравнении с пациентами с нормозооспермией.

**Ключевые слова:** фрагментация ДНК сперматозоидов, НВА-тест, SCD-тест.

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 [1, 2]. Отцовский эффект может быть связан с такими генетическими факторами, как генные мутации, микроделеции, анеуплоидии, повреждения ДНК и нарушения компактизации хроматина [3-5]. 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 зрелых сперматозоидов, а также фрагментация ДНК сперматозоидов [6]. 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, особенно на формирование бластоцисты и частоту наступления беременности в циклах ЭКО/ИКСИ [7]. Отклонения спермограммы пациента от нормы (астено-, олиго-, либо тератозооспермия) могут свидетельствовать о наличии численных или структурных хромосомных патологий в ядрах сперматозоидов. Исследование ядер сперматозоидов пациентов с астено-, олиго- или тератозооспермией при лечении бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) является необходимым этапом обследования для выбора дальнейшей тактики лечения [8].

**Целью** работы было исследовать степень зрелости сперматозоидов, а также определить содержание сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК у пациентов с астено-, олиго- и тератозооспермией.

**Материал и методы исследования.** В ходе подготовки к программе ЭКО/ИКСИ было обследовано 80 мужчин с целью анализа степени зрелости сперматозоидов и исследования содержания сперматозоидов, несущих

фрагментированную ДНК. Из них: 35 пациентов с астенозооспермией, 24 пациента с олигозооспермией и 21 пациент с тератозооспермией. Средний возраст пациентов был  $39,5 \pm 4,3$  лет. Группу контроля составили 20 пациентов с заключением спермограммы «нормозооспермия».

Протокол исследования фрагментации ДНК сперматозоидов. 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  $90-95^{\circ}\text{C}$ ; 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) (рис. 1). Содержание сперматозоидов в эякуляте, содержащих фрагментированную ДНК, в норме не должно превышать 20 % [9].

Определение степени зрелости сперматозоидов в эякуляте. 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 [10]. Для определения содержания зрелых спермиев 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 спермиев в эякуляте не должно превышать 20 % [11].

**Результаты исследования и их обсуждение.** В результате проведенного исследования у 47 мужчин (58,57 % пациентов) содержание незрелых форм спермиев и сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, в эякуляте превышало 20,00 %. Для 17 пациентов (21,25 % обследуемых) содержание незрелых сперматозоидов и сперматозоидов с поврежденной ДНК был в пределах нормы. У 10 пациентов (12,50 % мужчин) содержание незрелых спермиев превышало 20,00 %, однако процент сперматозоидов с фрагментированной ДНК был в пределах нормы. У оставшихся 6 пациентов выявлено менее 20,00 % незрелых сперматозоидов в эякуляте при повышенном (более 20,00 %) содержании сперматозоидов, несущих поврежденную ДНК. Результаты приведены в таблице 1.

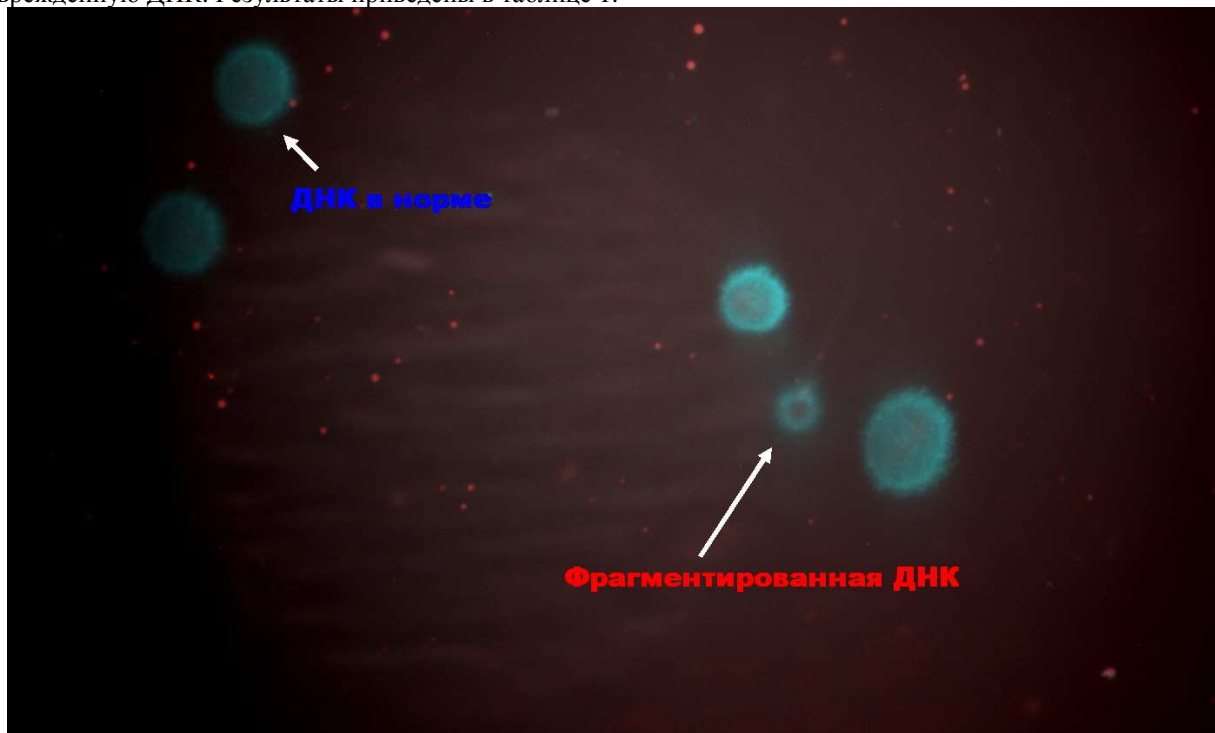


Рис. 1. Анализ фрагментации ДНК сперматозоидов методом SCD.

Среди пациентов, для которых было выявлено высокое содержание спермиев с фрагментированной ДНК, 27 пациентов имели заключение спермограммы «астенозооспермия» (77,1 % случаев астенозооспермии), 16 пациентов – с олигозооспермией (66,7 % случаев олигозооспермии), 10 пациентов – с тератозооспермией (47,6 % мужчин с тератозооспермией). В контрольной группе высокое содержание спермиев с

фрагментированной ДНК было выявлено у 2 пациентов (10,0 % пациентов с нормозооспермией). Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 1

**Результаты НВА-теста и исследования фрагментации ДНК сперматозоидов**

Результат исследования	Количество пациентов, N	Количество пациентов, %
НВА-тест: выше нормы, SCD-тест: выше нормы	47	58,57 %
НВА-тест: норма, SCD-тест: норма	17	21,25 %
НВА-тест: выше нормы, SCD-тест: норма	10	12,50 %
НВА-тест: норма, SCD-тест: выше нормы	6	7,50 %

Таблица 2

**Результаты исследования фрагментации ДНК сперматозоидов для пациентов с астено-, олиго-, терато- и нормозооспермией**

Заключение спермограммы	SCD-тест: содержание сперматозоидов с фрагментированной ДНК более 20 %	
	Количество пациентов, N	Количество пациентов, %
Олигозооспермия	16	66,7 %
Астенозооспермия	27	77,1 %
Тератозооспермия	10	47,6 %
Нормозооспермия	2	10,0 %

**Выводы**

Корреляция между результатами НВА-теста и анализа фрагментации ДНК сперматозоидов была установлена в 80,0 % случаев. Не выявлено значительных отличий по содержанию сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, для пациентов с астено-, олиго- и тератозооспермией. Однако, содержание спермиев с поврежденной ДНК значительно ( $p < 0,05$ ) выше у пациентов с показателями спермограммы, отличными от нормы, в сравнении с пациентами с нормозооспермией. Полученные данные статистически обработаны с помощью критерия Фишера [12]. Данное исследование подтверждает необходимость проведения анализа содержания незрелых форм сперматозоидов и спермиев, несущих фрагментированную ДНК, у пациентов с астено-, олиго- и тератозооспермией. Учитывая результаты исследования, данный анализ необходимо рассматривать как обязательный тест при обследовании пациентов с показателями спермограммы, отличными от нормы, перед программой ЭКО (экстракорпорального оплодотворения).

**Перспективы дальнейших исследований.** В ходе данной работы была исследована корреляция между наличием незрелых спермиев и сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, для пациентов с астено-, олиго- и тератозооспермией. Интересным представляется исследовать наличие анеуплоидий (численных хромосомных нарушений) в ядрах сперматозоидов у мужчин с повышенным содержанием незрелых форм спермиев в эякуляте. Перспективным является проведение преимплантационной генетической диагностики (ПГД) эмбрионов пациентов с высоким содержанием сперматозоидов с поврежденной ДНК в эякуляте.

**Литература**

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика... М.: Практика, 1999. – 460 с.
2. Мужское бесплодие и нарушение структурной организации хроматина сперматозоидов. Существует ли связь? / Воробьева О.А., Воскресенская А.В., Одинцов А.А., Филагов М.В. // Проблемы репродукции. – 2005. - № 6. – с. 56-62.
3. Assessment of DNA fragmentation and aneuploidy on poor quality human embryos. / Findikli N., Kahraman S., Kumtepe Y. // Reprod Biomed Online 2004. – V. 8, № 2. - P. 196-206.
4. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatin kinase, caspase-3 and Bcl<sub>xL</sub> levels in mature and diminished maturity sperm. / Cayli S., Sakkas D., Vigue L., Demir R., Huszar G. // Mol. Hum. Reprod. – 2004. / V. 10, № 5. - P. 365-372.
5. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using in-situ hybridization. / Sarah E. D., Sean P.F., Colin D. M. // Molecular Human Reproduction. -1997.-Vol. 3.-№ 7.-P. 585-598.
6. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. / Henkel R., Kierspel E., Hajimohammad M. et al. // Reprod Biomed Online. – 2003.- № 7. – P. 477-484.
7. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. / Tesarik J., Mendoza C., Greco E. // Hum Reprod. – 2002. - № 17. – P. 184-189
8. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional *in vitro* fertilization. / Hong Ye, Guo-ning Huang, Yang Gao, De Yi Liu // Hum. Reprod. – 2006. – V. 21, №6. – P. 1545-1550.
9. Semen quality is there a paternal effect on pregnancy outcome in in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection? / Oehninger S., Chaturvedi S., Toner J. et al. // Hum Reprod. – 1998. – № 13. – P. 2161-2164.
10. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. / Calle J.F., Muller A., Walschaerts M. et al. // Fertility and Sterility. - 2008. – V. 19, № 6. – P. 671-682.
11. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. / Seli E., Sakkas D. // Hum Reprod Update. - 2005. – V. 11, № 4. – P. 337-349.
12. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. / Brugnion F., Van Assche E., Verheyen G. et al. // Hum Reprod. – 2006. – V. 21, № 3. – P. 683-685.

Реферати

**ДОСЛІДЖЕННЯ ФРАГМЕНТАЦІЇ ДНК  
СПЕРМАТОЗОЇДІВ У ЧОЛОВІКІВ З  
ПІДВИЩЕНИМ ЗМІСТОМ НЕЗРІЛИХ ФОРМ  
СПЕРМІЇВ У ЕЯКУЛЯТІ**

**Феськов О.М., Феськова І.А., Жилкова Є.С.,  
Чумакова Н.О., Сомова О.В.**

Досліджено зв'язок між підвищеним змістом незрілих форм спермій та сперматозоїдів з фрагментованою ДНК у еякуляті у чоловіків з астено-, оліго- та тератозооспермією. Кореляція між результатами НВА-тесту та аналізу фрагментації ДНК сперматозоїдів встановлена у 80,0 % випадків. Доля спермій з пошкодженою ДНК значно ( $p < 0,05$ ) вища у пацієнтів з показниками спермограми, відмінними від норми, у порівнянні з чоловіками з нормозооспермією.

**Ключові слова:** фрагментація ДНК сперматозоїдів, НВА-тест, SCD-тест.

Стаття надійшла 23.12.2011 р.

**EXAMINATION OF SPERM DNA  
FRAGMENTATION FOR PATIENTS WITH HIGH  
CONTENT OF IMMATURE FORM OF  
SPERMATOZOA IN EJACULATE**

**Feskov O.M., Feskova I.A., Zhytkova I.S., Chumakova  
N.O., Somova O.V.**

The link between the content of the immature spermatozoa forms and spermatozoa with the fragmented DNA in ejaculate was examined for men with astheno-, oligo- and teratozoospermia. The correlation for the results of HBA-test and SCD-test was found out in 80.0 % of cases. The content of the spermatozoa with damaged DNA is significantly ( $p < 0,05$ ) higher in patients with the semen indices different from normal ones comparing with men with normozoospermia.

**Key words:** sperm DNA fragmentation, HBA-test, SCD-test.

УДК 616.314-611.013.38:611.018

**І.І. Якубова, Л.В. Гумановська, Л.Ф. Каськова**  
Приватний вищий навчальний заклад «Київський медичний університет УАНМ», Інститут фізіології  
імені О.О.Богомольця НАН України, м. Київ  
ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

**МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ЗАЧАТКІВ ЗУБІВ У ЕМБРІОНІВ МИШЕЙ ПІД ВПЛИВОМ CHOLESTEROL**

В експерименті на препаратах зачатків зубів 17-тиденних ембріонів мишей, що до та під час вагітності отримували холестерин виявлено значні морфологічні зміни, які свідчать про виражену функціональну дисфункцію амелобластів та одонтобластів.

**Ключові слова:** зачатки зубів, ембріони мишей, холестерол.

*Робота є фрагментом комплексної науково-дослідної теми кафедри терапевтичної стоматології спільно з кафедрою дитячої терапевтичної стоматології та профілактики стоматологічних захворювань Приватного вищого навчального закладу «Київського медичного університету УАНМ» «Використання біологічно-активних речовин і гомеопатичних препаратів у комплексному лікуванні карієсу та його ускладнень, захворювань пародонту та слизової оболонки порожнини рота» (державний реєстраційний номер 0106UO13099).*

Ризик виникнення карієсу зубів у майбутньої дитини збільшується при незбалансованому і нерациональному харчуванні вагітної жінки [4, 6, 8, 11, 12, 13, 12]. Відомо, що найбільші недоліки в харчуванні притаманні жінкам фертильного віку, які мають найбільший ризик виникнення захворювань аліментарного та аліментарнозалежного генезу [7]. Аналіз структури харчування раціонів різних груп населення, які проводилися протягом 2006–2010 років, свідчать, що найбільші порушення в харчовому статусі – це дефіцит макро- та мікроелементів (заліза, кальцію, фтору, йоду, селену), вітамінів (особливо антиоксидантного ряду), харчових волокон, повноцінних тваринних білків і надмірне споживання тваринних жирів і вуглеводів [2].

Постійним компонентом жирових продуктів є холестерин. Джерелом харчового холестерину є продукти тваринного походження, зокрема м'ясо, молоко та продукти його переробки (у тому числі і в сирах), жовтки яєць, вершкове масло, яловичий жир, сметана, мозок тварин [1, 9]. Надмірне споживання з їжею підвищеної кількості холестерину, призводить до збільшення його рівня в крові [5].

Холестерин (синонім холестерол<sup>1</sup>) – органічна сполука, природний жирний (ліпофільний) спирт, що міститься в клітинних мембранах усіх живих організмів за винятком безядерних (прокаріот) [5].

**Метою** роботи було вивчення впливу холестерину на структуру зачатків зубів ембріонів мишей.

**Матеріал і методи дослідження.** Експерименти проводили із дотриманням «Правил проведення робіт із використанням експериментальних тварин». Для експерименту були використані білі безпородні миші масою 25-28г (40 тварин). Тварин поділили на 2 групи: контрольну і дослідну.

Експериментальну гіперхолестеринемію моделювали додаванням в харчовий раціон холестерину (2 %) протягом 60 днів [3, 10]. Миші дослідної групи отримували раціон віварію із додаванням 2гр. холестерину (Cholesterol виробництва фірми Merck, Germany) на 100 гр. корму. Миші контрольної групи отримували раціон віварію. Через 30 днів самкам, що знаходилися в стадії проеструса (передтічка) і еструса (тічка) підсаджували