

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 aberrациями 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 aberrации.

Дослідження зв'язку між порушенням компактизації хроматину та наявністю анеуплоїдій в ядрах сперматозоїдів для чоловіків зі зниженою фертильністю

О.М.Феськов, Є.С.Жилкова, Н.М.Сотнік, 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 aberrациями 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 aberrції.

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 aberrации 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) дозволило ідентифікувати наявність хромосомних анеуплоїдій в ядрах сперматозоїдів людини. Використання декількох ДНК-зондів дає можливість дослідити наявність анеуплоїдій одночасно по декільком хромосомам в одному ядрі одночасно (Dohle et al., 2010).

Нарушення компактизації хроматину в ядрах сперматозоїдів, або фрагментація ДНК – відносно недавно виявлена передбачувана причина зниження фертильності у чоловіків (Findikli et al., 2004; Henkel et al., 2003). Розриви ДНК, виявляються в еякуляторних сперматозоїдах, можуть бути наслідком дефекту дозрівання в ході сперматогенезу (репарації та ремоделювання). С іншої сторони, не виключено, що такі дефекти можуть слугувати факторами запуску апоптозу (Hong Ye et al., 2006). В середньому близько 20% еякуляторних сперматозоїдів чоловіків з різними параметрами спермограми виявляються як апоптотичні. Встановлено, що фрагментація ДНК, як наслідок апоптозу, значно нижче в групі чоловіків з нормозоспермією порівняно з групами чоловіків з порушеннями параметрів класичної спермограми. Передбачається, що апоптоз слугує кінцевим результатом різних патологічних станів і системою деградації, контролюючої сперматогенез (Schlegel, Paduch, 2005; Seli, Sakkas, 2005; Tesarik et al., 2002). Аномалії хроматину сперматозоїдів часто асоційовані з низкими показателями спермограми, однак багато дослідників констатують, що параметри фрагментації не мають чіткої кореляції з такими параметрами сперми, як концентрація, подвижність, морфологія, рекомендованими для дослідження ВОЗ (Benchaib et al., 2003). В той же час поруч з авторами виявлено негативну кореляцію фрагментації ДНК з характеристиками спермограми: концентрацією, подвижністю і відсотком морфологічно аномальних сперматозоїдів (Muratori et al., 2008). Спорним також залишається питання про залежність ступеня фрагментації ДНК від віку пацієнта (Luke et al., 2010). В Україні ця проблема також досліджена недостатньо, в зв'язку з чим метою даної роботи стало дослідження зв'язку між наявністю анеуплоїдій і ступенем фрагментації ДНК в ядрах сперматозоїдів в еякуляті у чоловіків з зниженою репродуктивною функцією.

Методика

Для проведення дослідження була сформована група з 25 чоловіків, в віці від 28 до 54 років, проходивших лікування безпліддя методами допоміжних репродуктивних технологій (ВРТ) з використанням процедури екстракорпорального запліднення (ЕКО) на базі Центру репродукції людини, м. Харків. Від всіх пробандів отримано письмове інформоване згоду на участь в даному дослідженні.

Дослідження анеуплоїдій в ядрах сперматозоїдів проведено методом флуоресцентної гібридизації in situ (FISH). Для флуоресцентної гібридизації застосовувалися наступні ДНК-зонди: 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 денатурації ДНК препарат з доданими ДНК-зондами був впродовж 10 хвилин витриманий при температурі 75°C. Наступна гібридизація ДНК-зонда з ДНК-мішенню тривала 5 годин при температурі 42°C (Oehninger et al., 1998). Кількість хромосом в ядрі сперматозоїда визначалася за кількістю флуоресцентних сигналів. Для кожного пацієнта було оцінено не менше 400 ядер сперматозоїдів. Аналіз флуоресцентного сигналу проводився за допомогою флуоресцентного мікроскопа Nikon Eclipse 80i.

Аналіз фрагментації ДНК сперматозоїдів проводився методом SCD (sperm chromatin dispersion) (HaloSperm, Halotech, Іспанія). Метод оснований на дослідженні дисперсії хроматину навколо ядра, що дає можливість розрізнити сперматозоїди з різною ступенем фрагментації ДНК. Методом SCD сперма була розведена PBS (phosphate buffer saline, Sigma) до концентрації 5–10 млн/мл. Розведені зразки сперми поміщалися на покриті агарозним гелем предметні склянки, заздалегідь нагріті до температури 90–95°C, а потім проходили обробку кислотними і лизисними розчинами. Зафіксовані на склянках препарати, з метою дегідратації, були отримані в 70%, 90% і 96% розчинах етанолу. Результат задокументований за допомогою програми Lucia FISH (LIM, Чехія). Згідно рекомендацій Європейської асоціації урологів, вміст сперматозоїдів в еякуляті, що містить фрагментовану ДНК, в нормі не повинен перевищувати 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±1,9 лет.

Таблица 1.

Связь между хромосомными aberrациями 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±0,52	18,14±9,77	0,38	0,64	p>0,05
16	10	0,72±0,26	18,14±9,77	0,23	0,64	p>0,05
18	10	0,99±0,59	18,14±9,77	-0,51	0,64	p>0,05
21	10	1,13±0,73	18,14±9,77	-0,13	0,64	p>0,05
X, Y	10	1,34±0,94	18,14±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±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 aberrациями 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±0,33	14,38±5,07	-0,25	0,52	p>0,05
16	15	0,7±0,25	14,38±5,07	-0,41	0,52	p>0,05
18	15	0,98±0,62	14,38±5,07	0,42	0,52	p>0,05
21	15	0,84±0,37	14,38±5,07	0,05	0,52	p>0,05
X, Y	15	1,39±0,39	14,38±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.

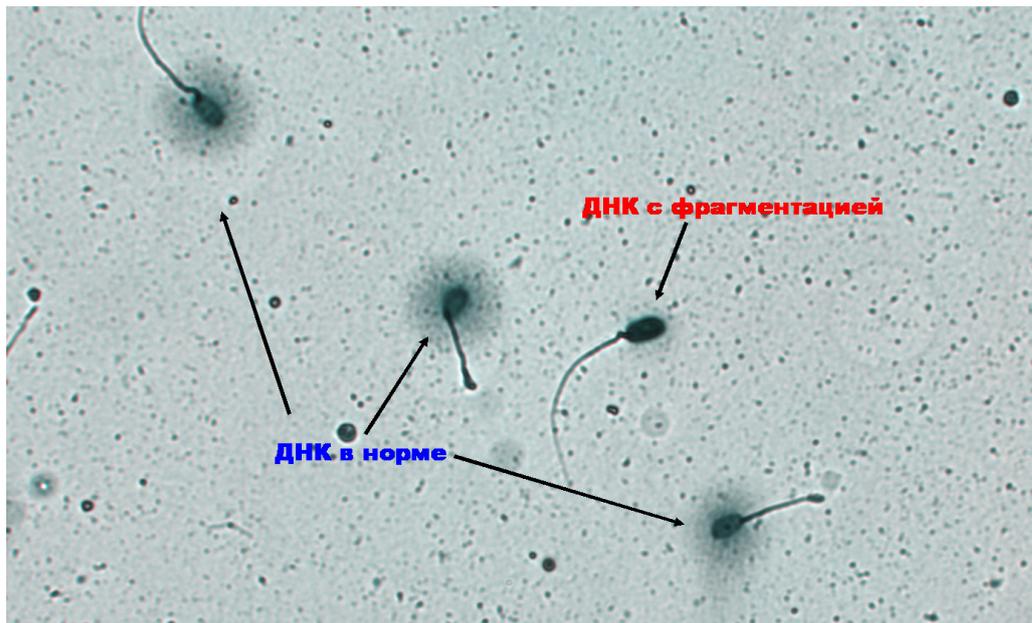


Рис. 1. Анализ фрагментации ДНК сперматозоидов методом SCD

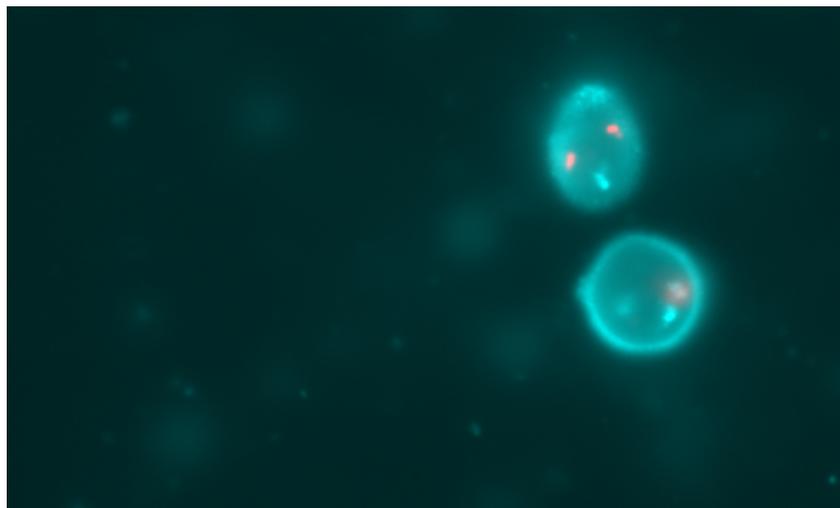


Рис. 2. Ядро анеуплоидного сперматозоида: красные сигналы – хромосомы 21, голубой сигнал – хромосома X

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 поврежденной 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.

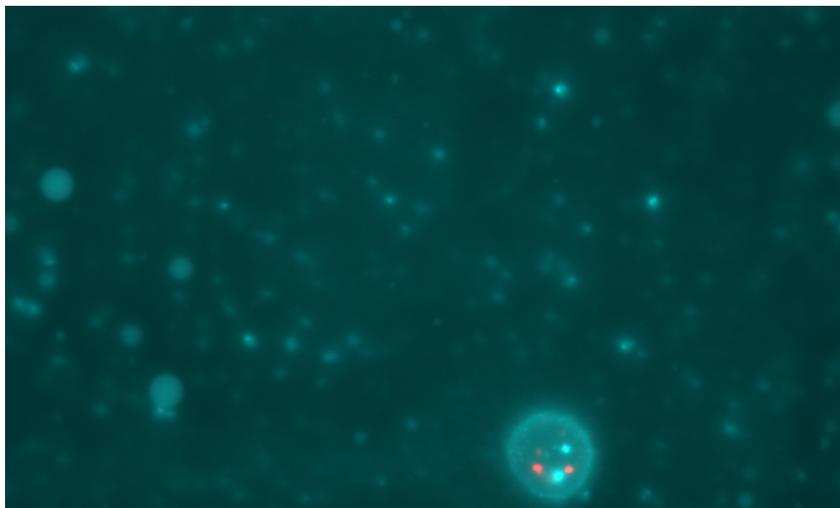


Рис. 3. Ядро анеуплоидного сперматозоида: красные сигналы – хромосомы 21, голубые сигналы – хромосомы 16

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. – С. 56–62./
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 460с. /Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. – М.: 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. – С. 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