

## ФРАГМЕНТАЦІЯ ДНК І ПРОЦЕСИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ У СПЕРМІЯХ ЛЮДИНИ ПРИ НОРМО- ТА ПАТОСПЕРМІЇ

**М. Петрушко\*, С. Павлович, В. Піняєв, Н. Волкова**

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України  
вул. Переяславська, 23, Харків 61015, Україна  
e-mail: petrushkom@mail.ru*

У зв'язку з тим, що зміни генетичного апарату сперміїв на рівні ДНК на сьогоднішній день є маловивченими, метою дослідження було визначити рівень фрагментації ДНК і його кореляцію з процесами апоптозу й перекисного окислення ліпідів у сперматозоїдах людини при нормо- та патоспермії. Проводили аналіз фрагментації ДНК сперматозоїдів за допомогою методу SCD (sperm chromatin dispersion). Визначали концентрацію малонового діальдегіду, активність супероксиддисмутази, загальну антиоксидантну активність. Методом ФАКС-аналізу досліджували процеси апоптозу та некрозу. В епідидимальних сперматозоїдах показник фрагментації ДНК був достовірно нижчим, ніж в еякуляторних. Активність супероксиддисмутази та малонового діальдегіду була достовірно вищою при олігоастенотератозооспермії порівняно із нормозооспермією. При цьому виявлено тенденцію до зниження загальної антиоксидантної активності порівняно з нормозооспермією. Факт зростання рівня процесів перекисного окислення ліпідів, апоптозу і некрозу сперматозоїдів при олігоастенотератозооспермії дає змогу запропонувати використання епідидимальних сперміїв у програмах лікування безпліддя методами допоміжних репродуктивних технологій.

*Ключові слова:* спермії, ДНК, нормозооспермія, олігоастенотератозооспермія, апоптоз, ПОЛ.

До 50 % усіх випадків безпліддя подружніх пар припадає на чоловічий фактор [2]. Зміни генетичного апарату сперміїв на рівні тотальної ДНК на сьогоднішній день є маловивченими.

Фрагментація ДНК сперматозоїдів – один із важливих факторів порушення чоловічої фертильності [14]. У нормі ДНК повинна мати певну конформацію, хімічну та фізичну структури. Будь-яке незначне пошкодження ДНК або її упаковки може привести до неправильного розвитку подій після проникнення дефектного спермія в яйцеклітину [17]. Проведений мета-аналіз продемонстрував взаємозв'язок між фрагментацією ДНК сперматозоїдів і результативністю програми ДРТ [12].

Певну роль у виникненні пошкодження ДНК сперміїв може відігравати апоптоз [10]. Окислювальний стрес являє собою ще один потенційний механізм, який може викликати фрагментацію ДНК [8]. Однак точні механізми, які беруть участь в етіології фрагментації ДНК сперматозоїдів, до сих пір не з'ясовані.

Метою дослідження було вивчити фрагментацію ДНК і ступінь її кореляції з процесами апоптозу та перекисного окислення ліпідів у сперматозоїдах людини при нормо- та патоспермії.

### **Матеріали та методи**

Матеріалом дослідження слугували еякуляти чоловіків-донорів, з їхньої письмової інформованої згоди. Спермограму виконували за стандартною методикою, рекомендованою ВООЗ [20].

© Петрушко М., Павлович С., Піняєв В., Волкова Н., 2016

Оцінку препаратів здійснювали на мікроскопі Olympus IX-71 («Olympus», Японія) при  $\times 1000$ . Виділення активної фракції сперміїв з еякуляту проводили у градієнті щільності Percoll (Sigma Pharmaceutical, Buchs, Switzerland) [15].

З метою проведення аналізу фрагментації ДНК сперматозоїдів було використано метод SCD (sperm chromatin dispersion) («Halo Sperm», Іспанія). Сперму розводили у фосфатному буфері («Sigma», США) до концентрації 5–10 млн / мл. Зразки сперми поміщали на покриті агарозним гелем предметні скельця, заздалегідь прогріті до температури 90–95 °С. Проводили обробку зразків кислотним і лізисним розчинами. З метою дегідратації фіксовані препарати відмивали у 70, 90 та 96 % розчинах етанолу. Після висушування на повітрі проводили аналіз препаратів за допомогою інвертованого мікроскопа Olympus IX-71 («Olympus», Японія). Інтерпретацію результатів проводили таким чином: сперматозоїд без фрагментації ДНК – «гало» більше або дорівнює діаметру ядра, сперматозоїд із фрагментованою ДНК – «гало» дорівнює або менше  $1/3$  діаметра ядра чи немає взагалі.

Концентрацію малонового діальдегіду (МДА) визначали за інтенсивністю забарвлення, що утворилася в ході реакції МДА та ТБК-активних продуктів [3]. Оптичну щільність вимірювали за допомогою спектрофотометра Shimadzu QV-50 (Японія) при довжині хвилі 535 нм.

Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за відновленням барвника нітросинього тетразолію. Вимірювали значення оптичної щільності при 540 нм. Активність СОД виражали в ум. од. (50 % інгібування окисно-відновної реакції) [11].

Загальну антиоксидантну активність (АОА) визначали в модельній системі суспензії жовточних ліпопротеїдів [1]. Оптичну щільність вимірювали при довжині хвилі 532 нм. Ініціювання ПОЛ здійснювали за допомогою іонів двовалентного заліза. Загальну АОА висловлювали у відсотках від пригнічення 50 % ПОЛ у модельній системі порівняно з класичним антиоксидантом іонолу.

Методом ФАКС-аналізу на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur («Becton-Dickinson», США) досліджували процеси деконденсації хроматину в сперміях з використанням реагентів («Becton-Dickinson», США). Для визначення наявності процесів деконденсації ядерного хроматину в сперміях використовували 7-аміноактиноміцин D (7AAD), для процесів апоптозу – Annexin V. Фарбування проводили відповідно до методики [16].

Результати аналізували за допомогою програми «Win MDI v.2.8» (США). Всі експерименти і визначення були проведені як мінімум з триразовим повторенням. При статистичній обробці результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз і t-критерій Стьюдента, а також програму Excel («Microsoft Office», США).

### Результати і їхнє обговорення

Були сформовані три групи залежно від показників сперматогенезу. Спермії з еякулятів чоловіків при нормозооспермії становили першу групу ( $n=10$ ), при олігоастенозооспермії – другу ( $n=12$ ), епідидимальні, виділені мікрохірургічно при пункції або аспірації епідидимусу – при азооспермії – третю ( $n=8$ ).

Загальна кількість виділених сперміїв становила  $79 \pm 15$ ;  $0,7 \pm 0,2$  і  $(0,02 \pm 0,01)$  млн – для першої–третьої груп відповідно ( $p < 0,001$ ). Прогресивною рухливістю характеризувалися  $55,2 \pm 0,5$ ;  $16,8 \pm 3,1$  та  $(22,2 \pm 0,1)$  % сперміїв у групах I–III відповідно. При нормозооспермії  $(42,8 \pm 9,3)$  % сперміїв характеризувалися нормальною морфологією, в той час, як при олігоастенотератозооспермії тільки  $(4,2 \pm 0,2)$  %. Для епідидимальних сперміїв цей показник становив  $(18,4 \pm 1,3)$  %.

Частка сперматозоїдів із фрагментацією ДНК виявилася достовірно нижчою в першій групі порівняно з другою, що свідчить про те, що морфофункціональні характеристики еякуляторних сперміїв можуть слугувати маркером інтактної ДНК (рис. 1).

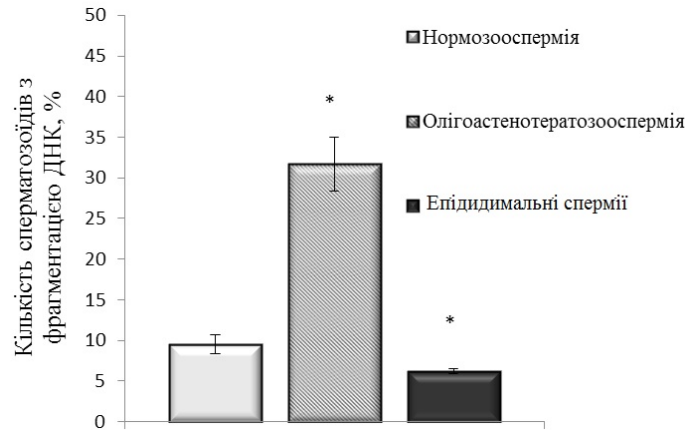


Рис. 1. Частота фрагментації ДНК у нативних сперматозоїдах при нормо- та патоспермії. \* – достовірність порівняно з нормозооспермією ( $p < 0,05$ ).

В епідідимальних сперматозоїдах показник фрагментації ДНК був достовірно нижчим, ніж в еякуляторних, і становив  $(6,2 \pm 0,3) \%$ .

У нормі процеси вільнорадикального окислення, зокрема, процеси ПОЛ, підтримуються на стаціонарному рівні завдяки роботі антиоксидантної системи. Активність СОД була достовірно вищою при олігоастенотератозооспермії порівняно з нормозооспермією. Підвищення активності СОД у сперміях чоловіків із патоспермією можна вважати компенсаторною реакцією на збільшення інтенсивності вільнорадикального окислення при порушенні сперматогенезу. У сперміях людини при патоспермії, порівняно з нормозооспермією, виявлено достовірне зниження активності АОА (табл. 1).

Активність МДА в сперміях людини була достовірно вищою при олігоастенотератозооспермії порівняно з нормозооспермією.

Виявлений підвищений рівень продуктів ПОЛ в еякуляті чоловіків з олігоастенотератозооспермією свідчить про несприятливий для сперматозоїдів стан активації перекисних процесів.

Таблиця 1

Концентрація МДА, СОД та АОА в сперміях чоловіків досліджуваних груп

Досліджувані групи	МДА, мкм/л	СОД, ум. Од	АОА, %
Нормозооспермія	$8,0 \pm 0,6$	$4,5 \pm 0,3^*$	$8,5 \pm 0,7$
Олігоастенотератозооспермія	$9,7 \pm 1,1$	$6,3 \pm 0,4^*$	$7,3 \pm 0,8$
Епідідимальні спермії	$8,2 \pm 0,6$	$3,2 \pm 0,3^*$	$8,0 \pm 0,9$

Примітка: \* – достовірність порівняно з нормозооспермією ( $p < 0,05$ ).

Цікавим виявився факт збільшення рівня МДА в сперміях, вилучених при біопсії яєчка. При цьому рівень СОД достовірно знижувався, а концентрація АОА відповідала рівню нормозооспермії.

У сперміях людини при нормозооспермії кількість апоптичних клітин становила  $(0,41 \pm 0,18) \%$  при вмісті живих клітин  $(96,16 \pm 0,18) \%$  (табл. 2). При олігоастенотератозооспермії кількість апоптичних і некротичних клітин достовірно зростала до  $1,41 \pm 0,12$  і  $(5,27 \pm 0,21) \%$ .

Для епідідимальних сперміїв спостерігалось зниження кількості некротичних клітин до  $(2,60 \pm 0,26) \%$ , в той час як кількість сперміїв у стані апоптозу достовірно не відрізнялася

порівняно з нормозооспермією (рис. 2). Цікавим виявився факт високої кореляції між процесами фрагментації ДНК й апоптозу в сперміях. Так, при олігоастенотератозооспермії цей показник був максимальним ( $r=0,88$ ,  $p<0,01$ ), а індекс фрагментації ДНК корелював з показником рівня МДА ( $r=0,95$ ,  $p<0,01$ ).

Таблиця 2

Кількість некротичних і апоптичних спермій у досліджуваних групах ( $M\pm m$ ), % ( $n=20$ )

Досліджувана група	Склад некротичних і апоптичних спермій		
	AnnexinV <sup>-</sup> /7AAD <sup>-</sup> , % (живі)	Annexin V <sup>+</sup> /7AAD <sup>-</sup> , % (апоптоз)	AnnexinV <sup>+</sup> /7AAD <sup>+</sup> , % (некроз)
Нормозооспермія	96,16±0,18	0,41±0,18	3,43±0,25
Олігоастенотератозооспермія	93,32±0,24*	1,41±0,12*	5,27±0,21*
Епідидимальні спермії	97,32±0,21*	0,18±0,15*	2,60±0,26*

**Примітка:** \* – достовірність порівняно з нормозооспермією ( $p<0,05$ ).

Аномалії хроматину сперматозоїдів часто асоційовані з низькими показниками спермограми, проте багато дослідників констатують, що параметри фрагментації ДНК не мають чіткої кореляції з показниками спермограми. Показана негативна кореляція фрагментації ДНК з характеристиками спермограми: концентрацією, рухливістю і відсотком морфологічно аномальних сперматозоїдів [9].

Нами виявлено підвищений вміст продуктів ПОЛ–МДА при олігоастенотератозооспермії порівняно з нормозооспермією. Наші результати узгоджуються з отриманими рядом інших авторів даними щодо ПОЛ у сперматозоїдах і спермальной плазмі [7].

Виявлений підвищений рівень продуктів ПОЛ у чоловіків з олігоастенотератозооспермією свідчить про несприятливий для сперматозоїдів стан активації перекисних процесів, який може реалізовуватися при різних функціональних станах: у порушенні рухливості, акросомальній реакції, при взаємодії з ооцитом, а також при аномальному розвитку ембріона, внаслідок порушення структури ДНК сперматозоїдів [6].

Наші дані про підвищення рівня пошкодження ДНК при олігоастенотератозооспермії узгоджуються з результатами S. Weng [19], у той час як G. Ricci не відзначав такої кореляції [13].

Найбільший інтерес становить зв'язок між фрагментацією ДНК спермій і рівня ПОЛ–МДА. Ці два параметри корелювали у групі з олігоастенотератозооспермією. Цей висновок перебуває у протиріччі з даними Zribi N. [21], однак у дослідженнях даного автора була залучена невелика кількість еякулятів, що свідчить про низьку вибірку дослідження.

У нашому дослідженні фрагментація ДНК сперматозоїдів позитивно корелює з частотою апоптичних клітин, однак індекс кореляції нижчий, ніж при окислювальному пошкодженні.

Окислювальний стрес визначається як дисбаланс між концентрацією прооксидантних і антиоксидантних молекул у біологічній системі при домінуванні змісту прооксидантів. Цей дисбаланс може призвести до пошкодження структури сперматозоїда і таких макромолекул, як компоненти мембрани цитоплазми, білки, ферменти і ДНК.

Незалежно від клінічного діагнозу і параметрів спермограми, наявність окисного стресу у безплідних чоловіків підтверджує, що активні форми кисню відіграють ключову роль у патофізіології чоловічого безпліддя. Вивчення процесів ПОЛ показало прямий взаємозв'язок вільних радикалів з такими характеристиками спермій, як капациація, взаємодія спермія з ооцитом, акросомальна реакція [4].

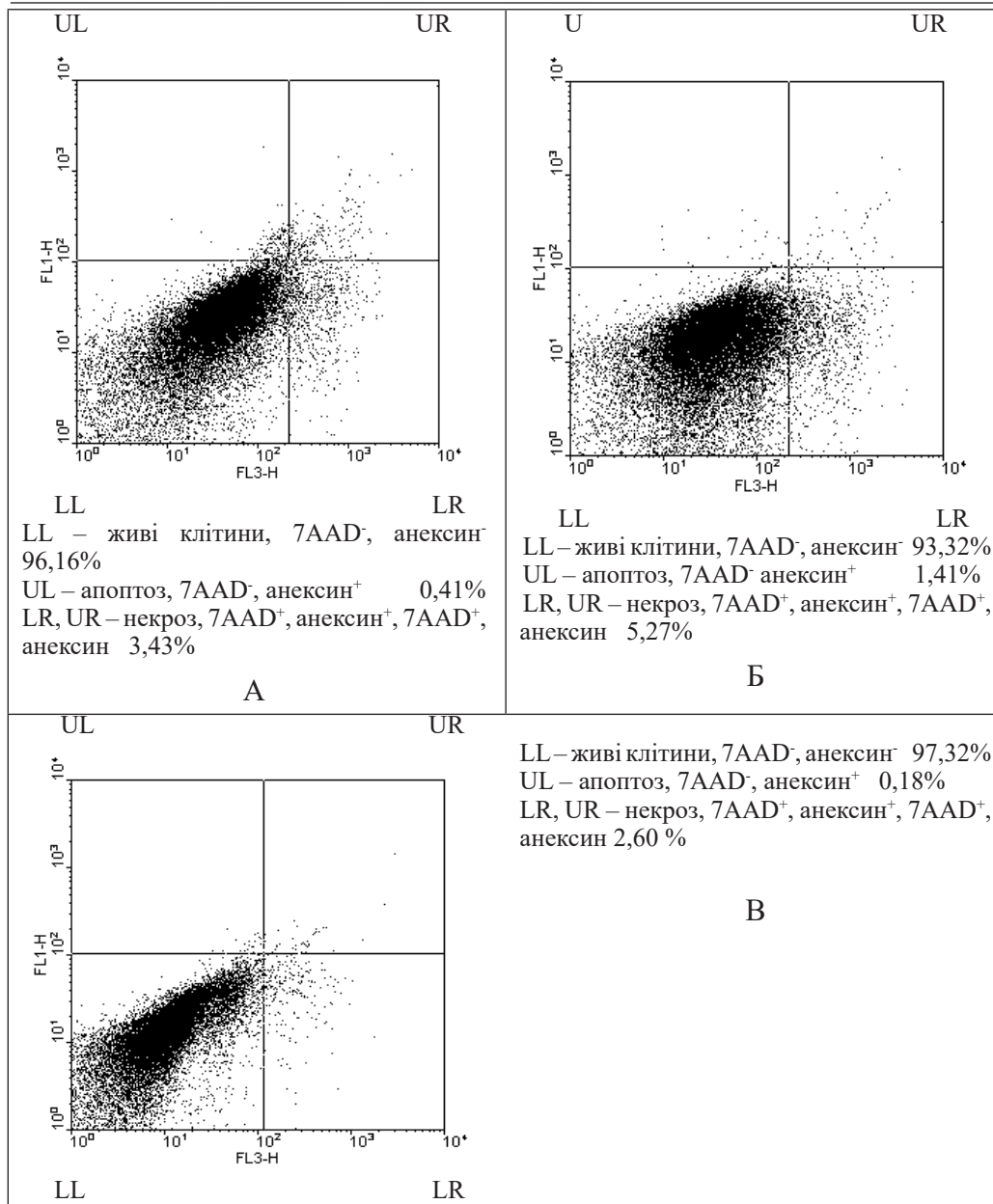


Рис. 2. Розподіл спермій досліджуваних груп, мічених Annexin / 7AAD: А – нормозооспермія; Б – олігоастенотератозооспермія; В – епідидимальні спермії

Фрагментацію ДНК сперми пов'язують не тільки з процесами ПОЛ і апоптозу. Показано, що фрагментація зростає при екстремально низьких і екстремально високих рівнях ФСГ та ЛГ і негативно корелює з рівнем тестостерону [18].

Оскільки механізм виникнення фрагментації ДНК пов'язаний з окислювальним стресом, то використання антиоксидантів може знизити цей показник. Для подолання ви-

сокого рівня фрагментації ДНК при олігоастенотератозооспермії варіантом вибору є використання епідидимальних сперматозоїдів, у яких дані процеси зменшені.

В останніх дослідженнях показано, що при звичних викиднях частота фрагментації ДНК сперматозоїдів чоловіків достовірно вища [5].

Таким чином, ступінь фрагментації ДНК у сперматозоїдах залежить від вихідних характеристик еякуляту, що вказує на необхідність оцінки морфофункціональних характеристик сперміїв.

Факт зростання процесів перекисного окислення ліпідів, апоптозу і некрозу сперматозоїдів при олігоастенотератозооспермії дає підстави запропонувати використання епідидимальних сперміїв у програмах лікування безпліддя методами допоміжних репродуктивних технологій.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Клебанов Г. І, Бабенкова І. В., Теселкін Ю. О. Оцінка антиокисних властивостей плазми крові із застосуванням жовтчних ліпопротеїдів // Лабораторна справа. 1988. № 3. С. 59–62.
2. Тавокина Л. В. Мужское бесплодие. Генетические аспекты // Почка. 2014. Т. 8. № 2. С. 9–13.
3. Agarwal A., Ikemoto I., Loughlin K. Relationship of sperm parameters to levels of reactive oxygen species in semen specimens // J. Urol. 1994. Vol. 152. N 1. P. 107–110.
4. Aitken R. J., Jones K., Robertson S. Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health // J. Androl. 2012. Vol. 33. N 6. P. 1096–1106.
5. Vareh G. M., Jacoby E., Binkley P. et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation assessment in normozoospermic male partners of couples with unexplained recurrent pregnancy loss: a prospective study // Fertil. Steril. 2016. Vol. 105. N 2. P. 329–336.
6. Benchaib M., Braun V., Lorna J. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique // Hum. Reprod. 2003. Vol. 18. N 5. P. 1023–1028.
7. Das P., Choudhari A. R., Singh A. K. Correlation among routine semen parameters, sperm viability and malondialdehyde levels in human subjects with different fertility potential // Indian. J. Physiol. Pharmacol. 2009. Vol. 53. N 3. P. 253–258.
8. Duru N., Morshedi M., Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa // Fertil. Steril. 2000. Vol. 74. N 6. P. 1200–1207.
9. Everson D., Larson K., Jost L. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques // J. Androl. 2002. Vol. 23. N 1. P. 25–43.
10. Gandini L., Lombardo F., Paoli D. et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa // Hum. Reprod. 2000. Vol. 15. N 4. P. 830–839.
11. Gomez E., Irvine D., Aitken R. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function // Int. J. Androl. 1998. Vol. 21. N 2. P. 81–94.
12. Osman H., Alsomait S., Seshadri T., El-Toukhy. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis // Reproductive Bio-Medicine Online. 2015. Vol. 30. N 2. P. 120–127.
13. Ricci G., Perticarari S., Fragonas E. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes // Hum. Reprod. 2002. Vol. 17. N 10. P. 2665–2672.
14. Sakkas D., Alvarez J. Sperm DNA. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis // Fertil. Steril. 2010. Vol. 93. N 4. P. 1027–103.

15. Sakkas S., Manicardi G., Tomlinson M. et al. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies // *Hum. Reprod.* 2000. Vol. 15. N 5. P. 1112–1116.
16. Schmid I., Krall W. J., Uittenbogaart Ch. et al. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry // *Cytometry.* 1992. Vol. 13. N 2. P. 204–208.
17. Tesarik J., Mendoza C., Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI // *Hum. Reprod.* 2002. 17. 184–189.
18. Wdowiak A., Raczkiewicz D., Stasiak M. Levels of FSH, LH and testosterone, and sperm DNA fragmentation // *Neuro Endocrinol. Lett.* 2014. Vol. 35. N 1. P. 73–79.
19. Weng S., Taylor S., Morshedi M. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm // *Mol. Hum. Reprod.* 2002. Vol. 8. N 11. P. 984–991.
20. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen fifth edition // World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. 2010. P. 287.
21. Zribi N., Chakroun N., Elleuch H. Sperm DNA fragmentation and oxidation are independent of malondialdehyde // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2011. Vol. 47. N 9. P. 1–8.

*Стаття: надійшла до редакції 22.04.16*

*доопрацьована 01.08.16*

*прийнята до друку 06.09.16*

## **DNA FRAGMENTATION AND LIPID PEROXIDATION PROCESSES OF HUMAN SPERM CELLS AT NORMO- AND PATHOSPERMIA**

**M. Petrushko, O. Pavlovich, V. Pinyaev, N. Volkova**

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine  
23, Pereyaslavka St., Kharkiv 61015, Ukraine  
e-mail: petrushkom@mail.ru*

Due to the fact that the changes of spermatozoa genetic apparatus are insufficiently studied at the DNA level today, the research aim was to determine the DNA fragmentation and its correlation with their apoptosis and lipid peroxidation processes in human spermatozoa at normo- and pathospermia. The analysis of spermatozoa DNA fragmentation was conducted using the SCD (sperm chromatin dispersion) method. We have determined the malondialdehyde concentration, the superoxidizedismutase activity and the total antioxidant activity. The chromatin decondensation processes of spermatozoa were investigated by FACS-analysis. In epididymal spermatozoa the DNA fragmentation index was significantly lower than in the ejaculatory spermatozoa. The SOD activity in spermatozoa was significantly higher at oligoasthenoteratozoospermia than at normozoospermia case. There was shown the significant decrease of total antioxidant activity in human spermatozoa at pathospermia compared with the normozoospermia. The malondialdehyde activity in human spermatozoa was significantly higher at oligoasthenoteratozoospermia activity than at normozoospermia. There was shown that the spermatozoa DNA fragmentation degree depends on the initial ejaculate characteristics, this indicates a need to evaluate the morphological and functional characteristics of spermatozoa. The fact of lipid peroxidation, apoptosis and necrosis rising in spermatozoa at oligoasthenoteratozoospermia allows us to offer the usage of epididymal spermatozoa in the programs of infertility treatment by the assisted reproductive technology methods.

*Keywords:* sperm, DNA, normozoospermia, oligoasthenoteratozoospermia, apoptosis, lipid peroxidation.