

# Нарушения структуры хроматина сперматозоидов: клиническое значение, причины, диагностика, лечение (обзор литературы)

В.А. БОЖЕДОМОВ<sup>1,2,3</sup>, И.В. ВИНОГРАДОВ<sup>1</sup>, Н.А. ЛИПАТОВА<sup>1</sup>, Е.А. СПОРИШ<sup>3</sup>, И.М. РОХЛИКОВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра клинической андрологии ФПКМР ГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов»; <sup>2</sup>кафедра акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии ФГПОВ ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова; <sup>3</sup>ФГБУ «Поликлиника №1» Управления делами президента РФ, Москва

На основании анализа научных публикаций последнего десятилетия авторы обзора делают заключение, что изменения соотношения гистоны/протамины, нарушения упаковки и возникновение разрывов нити ДНК (фрагментация) сопровождаются снижением фертильности, увеличением риска аномалий зародыша и выкидыша. Ведущей экзогенной причиной повышенной фрагментации ДНК является оксидативный стресс. Рассмотрены пути коррекции данных нарушений: устранение этиологических факторов, применение антиоксидантов, режимов обработки спермы и ВРТ.

*Ключевые слова:* хроматин, мутации, хронические инфекции, сперматозоиды, ауноплодия.

Снижение фертильности мужчин обусловлено недостаточным количеством сперматозоидов и/или их плохим качеством. Последние годы в качестве лабораторного критерия качества сперматозоидов стали применять оценку структурных нарушений хромосом: адекватную упаковку и наличие разрывов (фрагментации) ДНК [1–4].

В норме хроматин зрелых сперматозоидов плотно упакован, чтобы защитить ДНК от потенциальных повреждающих воздействий во время транзита по мужскому и женскому репродуктивному тракту. Высокая плотность упаковки хроматина достигается за счет замены белков-гистонов, характерных для всех соматических клеток организма, на специальные переходные белки и протамины. Пусковым механизмом служит модификация гистонов: специфическое метилирование, ацетилирование, фосфорилирование или убиквитинилирование [5, 6]. Этот процесс начинается в мейозе и продолжается до выхода сперматозоидов из придатка. В норме по завершении сперматогенеза и созревания сперматозоидов протамины составляют не менее 85% белков нуклеосом [7].

Можно выделить несколько уровней структурных аномалий хроматина сперматозоидов: 1) нарушение физической целостности молекулы ДНК в виде разрыва одной или обеих полинуклеотидных цепей (фрагментация); 2) дефекты ядерных белков, препятствующие замене гистонов на протамины и последующему уплотнению ДНК; 3) нарушения пространственной третичной структуры хроматина [8–11].

Цель настоящего обзора — показать роль аномалий хроматина сперматозоидов в нарушениях репродуктивной функции.

## **Влияние нарушений структуры хроматина сперматозоидов на фертильность**

В последнее десятилетие многими исследованиями установлен факт снижения фертильности, эффективности методов ВРТ и повышения риска врож-

денных уродств при увеличении уровня фрагментации ДНК в сперматозоидах [12–17]. Вероятность оплодотворения *in vivo* и при внутриматочной инсеминации близка к нулю, если количество сперматозоидов с повреждением ДНК превышает 25–30% [18, 19]. Количество сперматозоидов с повреждением ДНК выше у мужчин из пар с привычным невынашиванием [14, 20, 21]. Предполагается, что до 40% выкидышей может быть предсказано с помощью оценки целостности спермальной ДНК [22]. Выполненные недавно метаанализы опубликованных работ, посвященных роли фрагментации ДНК в нарушении фертильности, установили, что риск спонтанных аборт и нарушений развития зародыша после ЭКО и ИКСИ увеличивается в 2,2–2,5 раза, если количество сперматозоидов с разрывами ДНК превышает 30% [14, 23], и что нет различий при использовании стандартного протокола ЭКО и ИКСИ [24]. Согласно последним исследованиям [25], повышение частоты спонтанных абортов после ЭКО и ИКСИ происходит при 20% сперматозоидов с фрагментацией ДНК, причем при количестве сперматозоидов с разрывами ДНК выше 30% риск выкидыша возрастает более чем в 20 раз. В то же время имеются исследования, авторы которых не обнаружили значимой взаимосвязи фрагментации ДНК и результатов оплодотворения/качества зародыша после ИКСИ [26, 27]. V. Beshay и O. Bukulmez [4], авторы последнего обзора на эту тему, названного «Sperm DNA damage: how relevant is it clinically?», придерживаются мнения большинства коллег, в соответствии с которым фрагментация ДНК спермы ассоциируется с более низкой частотой беременности при естественном зачатии и внутриматочной инсеминации, но полагают, что вряд ли она влияет на результаты ИКСИ, к сожалению, существующие методы оценки фрагментации предоставляют очень мало конкретной

e-mail: bojedomov@mail.ru

информации о характере и степени тяжести повреждения ДНК [4]. В целом, существующие данные достаточно убедительны, чтобы включить оценку фрагментации спермальных ДНК в алгоритм обследования при бесплодном браке и привычном невынашивании, но требуют совершенствования методов и уточнения норм [14, 28, 29].

Данные о влиянии нарушений соотношения между гистонами и протаминами менее очевидны. В ряде исследований [30, 31] не обнаружено существенной корреляции между дефицитом протаминов и нарушениями оплодотворения, качеством эмбрионов и результатами ЭКО/ИКСИ. В других работах [17, 32–34] показано, что дефицит протаминов и увеличение доли гистонов ведет к преждевременной конденсации хроматина, что является причиной сбоев в оплодотворении и развитии эмбриона. Некоторые авторы [35, 36] отмечают наличие прямой корреляции между повышенным содержанием сперматозоидов с фрагментацией ДНК в зрелых сперматозоидах и содержанием сперматозоидов с аномальной упаковкой хроматина, другие [37] считают, что популяция незрелых сперматозоидов не ассоциирована с повышенной фрагментацией ДНК. Предполагают, что уменьшение доли протаминов делает хроматин более чувствительным к повреждающим воздействиям [38]. Значимой разницу в качестве зародыша между группами можно считать при величине выше 30% аномальных сперматозоидов по белковому составу хроматина [39].

Пространственная структура хроматина сперматозоидов в аспекте фертильности изучена меньше всего. Имеются косвенные данные, что нарушения конденсации хроматина и вакуолизация головок сперматозоидов, по данным электронной микроскопии (ЭМИС), наряду с деформацией головки, наличием цитоплазматических капель, дефектами акросомы и шейки ассоциированы с меньшим успехом ЭКО и ПЭ [2, 40, 41]. Недавние исследования J. Franco и соавт. [42] показали положительную взаимосвязь нарушения упаковки хроматина, содержания протаминов и присутствия большой ядерной вакуоли. Но в сходном исследовании S. Watanabe и соавт. [43] не обнаружили взаимосвязи крупных вакуолей, с одной стороны, и структурных хромосомных aberrаций и фрагментации ДНК сперматозоидов, — с другой. Для описания аномальной конденсации хроматина сперматозоидов при ЭМИС некоторые отечественные исследователи [44] используют термин «незрелый хроматин», что характеризуется наличием грубогранулярного и фибриллярного компонентов нуклеоплазмы, обычно характерного для удлинённых сперматид.

Не до конца ясно, как взаимосвязаны аномалии хроматина с показателями стандартной спермограммы: концентрацией, подвижностью, морфологией сперматозоидов. Предполагают, что апоптоз, призна-

ком которого является фрагментация ДНК, служит конечным результатом различных патологических состояний и системой деградации, контролирующей сперматогенез [45, 46]. Показана корреляция индекса фрагментации ДНК с числом лейкоцитов, жизнеспособностью, подвижностью, морфологией [13, 42, 47–50]. Однако некоторые исследователи [51, 52] констатируют, что величина фрагментации ДНК не всегда связана с параметрами спермограммы — сперматозоид, морфологически расцененный как «нормальный», может иметь поврежденную ДНК [13, 53, 54]. Более того, по мнению некоторых авторов [55], фрагментация ДНК морфологически нормальных сперматозоидов оказывает особо негативное влияние на качество эмбрионов и результаты циклов ИКСИ.

Поскольку появление разрывов в структуре ДНК при репликации — неизбежный процесс в период сперматогенеза, в норме существуют механизмы биологического «ремонта» мужского генома. Имеются данные, что яйцеклетка в определенной степени способна восстанавливать повреждения ДНК оплодотворившего ее сперматозоида [56, 57]. Однако, когда повреждение ДНК сперматозоида слишком велико, репаративных способностей яйцеклетки может оказаться недостаточно [6, 58]. Тем более это оказывается невозможным в физиологически неполноценных яйцеклетках, полученных от женщин старшей возрастной группы и/или после гиперстимуляции [59]. R. Aitken и соавт. [60, 61] предположили, что попытки неэффективной репарации спермальной ДНК яйцеклеткой могут вызывать мутагенный эффект, приводящий к врожденным аномалиям и детским ракам.

#### Методы исследования нарушений структуры хроматина

Для исследования повреждения хроматина сперматозоидов предложено несколько методов (табл. 1) [62].

По данным недавнего метаанализа привычное невынашивание беременности более строго связано с данными TUNEL, чем COMET, или акридиновым оранжевым [14].

Недавно предложен новый метод детекции повреждения ДНК сперматозоидов, основанный на применении синтетического пептида, состоящего из 21 аминокислоты (DW1), связанного флуоресцентным красителем rhodamine B и взаимодействующего с критическим регионом p53 [63]. Хотя DW1 в настоящее время требует удаления оболочки с использованием детергента, дальнейшее совершенствование метода, по мнению авторов, позволит использовать его для отбора жизнеспособных сперматозоидов с неповрежденной ДНК в программе ИКСИ.

Отсутствие консенсуса при определении клинически значимых стандартов определения фрагментации ДНК и значимых пороговых уровней создает

**Таблица 1. Методы анализа структуры хроматина сперматозоидов (по М. Tavalae и соавт., 2008, [62] с исправлениями и добавлениями)**

Метод	Принцип	Метод детекции	Основные преимущества	Основные недостатки
TUNEL	Единичные и двойные разрывы нити ДНК	Флюоресцентная микроскопия/проточная цитометрия	Клинически значимый, высокочувствительный и специфичный, большое количество сперматозоидов подсчитано с помощью метода проточной цитометрии	Необходимо наличие специального оборудования; более дорогостоящий метод
COMET	Единичные и двойные разрывы нити ДНК или только двойные разрывы нитей ДНК	Флюоресцентная микроскопия	Сопоставим с TUNEL-методом: недорогой; высокочувствительный; возможность количественного анализа повреждения ДНК в отдельных клетках; оценка различных типов повреждений ДНК	Необходимо наличие специального оборудования и опытного лаборанта
SCD	Оценка ореола депирализации ДНК	Флюоресцентная микроскопия/оптическая микроскопия	Сопоставим с тестом SCSA; недорогой; простой в исполнении	Клиническая значимость метода уточняется
СМАЗ	Оценка дефицита протаминов в хроматине	Флуоресцентная микроскопия	Клинически значимый; высокочувствительный и специфичный	Необходимо наличие специального оборудования; отличить положительные и отрицательные результаты для сперматозоидов не всегда легко
Aniline blue	Оценка лизина, оптическая микроскопия остатков сохранившихся гистонов	Оптическая микроскопия	Клинически значимый; высокочувствительный и специфичный; недорогой, простой в исполнении	Клиническая значимость метода пока не доказана; противоречивость результатов из-за субъективной оценки
Acridine orange	Разделение одно- и двухцепочечных ДНК	Флюоресцентная микроскопия	Простой в исполнении; недорогой	Необходимо наличие специального оборудования; отличить сперматозоиды различных категорий не всегда легко
SCSA	Чувствительность ДНК к кислотной денатурации, определяемая при помощи проточной цитометрии	Проточная цитометрия	Клинически значимый; высокочувствительный и специфичный; большое количество сперматозоидов подсчитано с помощью метода проточной цитометрии; объективный количественный анализ ДНК, связанного с акридиновым оранжевым	Необходимо наличие специального оборудования; более дорогостоящий метод
ЭМИС	Разделение грубогранулярного и фибриллярного компонентов нуклеоплазмы сперматозоидов	Электронная микроскопия	Клиническая значимость уточняется	Необходимо наличие специального оборудования; субъективный метод; высокая трудоемкость при количественной оценке
Raman microspectroscopy	Различия между интактной и фрагментированной ДНК	Микроспектроскопия	Метод требует проверки, но потенциально может служить для оценки статуса ДНК живых сперматозоидов	Необходимо наличие специального оборудования; более дорогостоящий метод

проблемы в осуществлении рутинного применения оценки целостности ДНК спермы в повседневной практике [1, 25].

### **Причины структурных нарушений ДНК сперматозоидов**

После завершения упаковки хроматина на завершающих стадиях сперматогенеза большая часть ДНК ассоциирована с протаминами, только 5—15% остается связанной с гистонами. Предполагают, что эти участки после оплодотворения первыми становятся местами транскрипции и нужны для активации всего мужского генома. Но из-за того, что в этих участках ДНК остаются не защищенными протаминами, они особенно чувствительны к действию повреждающих факторов [35, 64]. Генотоксикантами

являются (табл. 2) радиация, электромагнитное излучение, некоторые химические вещества (диоксид, пестициды, формальдегиды и др.) [65].

В перечень причин повреждения ДНК сперматозоидов в последнее время включен низкодозированный финостерид [66], некоторые соматические заболевания, в том числе гипертоническая болезнь [67]. Но главной причиной негативного воздействия активных форм кислорода (АФК) на ДНК сперматозоидов считается прямое действие активных радикалов на незащищенные протаминами участки ДНК и опосредованная эндонуклеазами индукция апоптоза после повреждения клетки [3, 68, 69]. Признаком оксидативного повреждения сперматозоидов является появление особой окисленной формы ДНК — 8-hydroxy, 2'-deoxyguanosine (8OHdG) [70].

**Таблица 2.** Эффекты отдельных химических и физических факторов на качество хромосом сперматозоидов и потенциальные механизмы этого влияния (по G. Delbès и соавт., 2010 [65] с добавлениями)

Фактор	Качество спермы	Вид	Методика	Механизм	Литература
Облучение	Анеуплоидия	Мыши	FISH		Sailer и соавт., 1995a
	Неправильная структура хроматина	Мыши	SCSA		
	Разрывы цепочки ДНК	Мыши	COMET		Haines и соавт., 2002
Повышенная температура	Мутации	Мыши	Tandem repeat assay		Yauk и соавт., 2002
	Неправильная структура хроматина	Мыши	SCSA		Paul и соавт., 2008
Химиотерапевтические вещества	Анеуплоидия	Человек	FISH		Tempest и соавт., 2008
	Неправильная структура хроматина	Человек	SCSA		O'Flaherty и соавт., 2009
	Разрывы цепочки ДНК	Человек	COMET/TUNEL		
	Низкая замена протаминами	Человек	CMA3		
	Изменение профиля метилирования ДНК	Крыса	RLGS and qAMP		Unpublished
Эстрадиол/генистеин	Изменение в белковом составе (протеоме) ядерного матрикса	Крыса	2D gels		Codrington и соавт., 2007
	Разрывы цепочки ДНК	Человек	COMET	Причина оксидативного стресса	Anderson и соавт., 2003
ПХДs/p (полихлорированные дифенилы), p'-ДДЕ (дихлордифенилдихлорэтилен)	Неправильная структура хроматина	Человек	SCSA		Kruger и соавт., 2008
	Разрывы цепочки ДНК	Человек	TUNEL		Stronati и соавт., 2006
Фталаты	Единичные разрывы цепочки ДНК	Человек	COMET assay	Метаболиты окисления	Hauser и соавт., 2007
Свинец	Неправильная структура хроматина	Человек	SCSA	Оксидативный стресс	Hsu и соавт., 2009
	Низкая замена протаминами	Человек	Proteomics	Взаимодействие с протамином 2	Quintanilla-Vega и соавт., 2000
Железо		Крыса	8-oxodG levels		Wellejus и соавт., 2000
Кадмий	Фрагментация ДНК	Крыса	DNA fragmentation assay		Manna и соавт., 2008
Загрязнение воздуха	Мутации	Мыши	Tandem repeat assay		Somers и соавт., 2002
	Неправильная структура хроматина	Человек	SCSA		Rubes и соавт., 2007

По данным недавнего Кохрановского обзора [71], от 30 до 80% мужчин субфертильны в результате повреждающего действия оксидативного стресса (ОС) на сперматозоиды; по нашим данным, — около 40% [72].

Среди факторов, приводящих к повреждению ДНК в результате ОС, кроме перечисленных выше, считают: перекут яичка, образ жизни (избыточная масса тела, курение, высокие физические нагрузки), нехватку естественных антиоксидантов, электромагнитное излучение, инфекционно-воспалительные процессы репродуктивного тракта, варикоцеле, сахарный диабет, репротоксиканты (хлорорганические соединения, пестициды и др.) (табл. 3).

### **Преодоление бесплодия и невынашивания беременности, вызванного структурными нарушениями хромосом сперматозоидов**

Первым этапом является изменение образа жизни и *устранение факторов риска*, приводящих к нарушениям структуры хромосом: перегревания, курения, ожирения, действия репротоксикантов, в том числе выхлопных газов автомобилей и др. (см. табл. 2 и 3).

Вторым этапом является *этиотропное лечение* потенциально устранимых заболеваний: варикоцеле и инфекционно-воспалительных процессов дополнительных половых желез. Показано, что варикоцеле может восстановить повреждения ДНК у бесплодных мужчин с клиническим варикоцеле

**Таблица 3. Причины ОС сперматозоидов**

Причина	Литература
Дефицит антиоксидантов в продуктах питания	Eskenazi и соавт., 2005; Therond и соавт., 1996; Silver и соавт., 2005; Fraga и соавт., 1991; Song и соавт., 2006; Aitken, Koppers, 2011; P. Gharagozloo, R. Aitken, 2011
Чрезмерное потребление алкоголя	Wu, Cederbaum, 2003; Koch и соавт., 2004; Maneesh и соавт., 2006
Усиленное занятие спортом	Peake и соавт., 2007; Manna и соавт., 2004
Избыточная масса тела	Singer, Granger, 2007; Banks и соавт., 2005; Perez-Crespo и соавт., 2007; R. Rybar и соавт., 2011
Психологические стрессы	Fenster и соавт., 1997; Eskiocak и соавт., 2005
Возраст	Junqueira и соавт., 2004; Wyrobek и соавт., 2006; Singh и соавт., 2003; Moskovtsev 2006; Desai и соавт., 2009; В.А. Божедомов и соавт., 2008
Фтолаты	Kasahara и соавт., 2002; Hausere и соавт., 2007; Lee и соавт., 2007
Курение	A. Calogero и соавт., 2009; Hammadeh и соавт., 2010
Пестициды (типа линдана, метоксихлора), гербициды	Chitra и соавт., 2001; Latchoumycandane и соавт., 2002; Latchoumycandane и соавт., 2003
Диоксид серы, дизельные микрочастицы	Meng, Bai, 2004; Gonzalez-Flecha, 2004; Alaghmand, Blough, 2007
Кадмий и литий	Hsu, Guo, 2002; Acharya и соавт., 2003
Излучение мобильного телефона	Kesari и соавт., 2010
Некоторые лекарственные препараты (циклофосфамиды, аспирин, парацетамол)	Das и соавт., 2002; Ghosh и соавт., 2002; Agarwal, Said, 2005
Простатит: бактериальный; абактериальный	Mazzilli и соавт., 1994; Depuydt и соавт., 1996; Ochsendorf, 1999; Potts и соавт., 2000; Padron и соавт., 1997; Brackett и соавт., 2008; В.А. Божедомов и соавт., 2008; Семенов и соавт., 2010; Sarkar и соавт., 2011; Pasqualotto и соавт., 2000; Shahed, Shoskes, 2000; Potts, Pasqualitis, 2003; Batstone и соавт., 2002; Motrich и соавт., 2005; Motrich и соавт., 2007
Хламидии, микоплазмы, уреоплазмы	Segnini и соавт., 2003; Zhang и соавт., 2011
Патогенные вирусы: вирус простого герпеса, ВИЧ-инфекция, гепатиты В и С	Kapranos и соавт., 2003, Bezold и соавт., 2007; Umapathy и соавт., 2001; Chen, Siddiqui, 2007; Seronello и соавт., 2007; Durazzo и соавт., 2006; Vicariet и соавт., 2006
Хронические инфекции: туберкулез, малярия, болезнь Chagas	Srinivasan и соавт., 2004; Guha и соавт., 2006; Масао и соавт., 2007
Вазэктомия	Filippini и соавт., 2001; Shapiro и соавт., 1998; Kolettis и соавт., 1999; Sharma и соавт., 1999; Nandipati и соавт., 2005
Варикоцеле	Hendin и соавт., 1999; Barbieri и соавт., 1999; Saleh и соавт., 2003; Nallella и соавт., 2004; Chen и соавт., 2004; Smith и соавт., 2006; Agarwal и соавт., 2006; Ishikawa и соавт., 2007; Smith и соавт., 2007; В.А. Божедомов и соавт., 2008, 2009; Dada и соавт., 2010; На и соавт., 2010; Eisenberg, Lipshultz, 2011; L. Azadi и соавт., 2011; Y. Wang и соавт., 2012
Крипторхизм и орхипексия	Smith и соавт., 2007
Перекрыт яичка	Turner и соавт., 2004; Filho и соавт., 2004
Сахарный диабет	Shrilatha, Muralidhara, 2007
Почечная недостаточность: хроническая, гемодиализ, трансплантация почки	Oberg и соавт., 2004; Danielski и соавт., 2003; Pupim и соавт., 2004; Moreno и соавт., 2005
Гемоглобинопатии (в том числе бета-талассемия)	Livrea и соавт., 1996; Carpino и соавт., 2004
Гипергомоцистеинемия	Bezold и соавт., 2001; Park и соавт., 2005; Zhou-Sip и соавт., 2007
Ятрогенные факторы (центрифугирование, криоконсервация)	Iwasaki, Gagnon, 1992; Shekarriz и соавт., 1995; Potts и соавт., 2000; Watson, 2000;
Аутоиммунные реакции против сперматозоидов	В.И. Ушакова и соавт., 2001; В.А. Божедомов и соавт., 2008, 2010
Идиопатическое бесплодие (терато-, нормозооспермия)	Gomez и соавт., 1996; Garrido и соавт., 2004; Said и соавт., 2004; Said и соавт., 2005; Pasqualotto и соавт., 2001; Agarwal и соавт., 2006; В.А. Божедомов и соавт., 2008, 2009

[73—75]. Лечение хронического бактериального простатита и урогенитальных инфекций (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma*), сопровождающихся повышением уровня АФК, приводит к снижению выраженности ОС, нормализации показателей спермограммы и фрагментации ДНК [76, 77]. Так же необходима оптимальная терапия системных заболеваний, при-

водящих к повреждению ДНК: сахарного диабета, гипертонии, почечной недостаточности.

Третий этап — *патогенетическое лечение* в случаях, когда оно возможно. К патогенетически обоснованному лечению при повышенной фрагментации ДНК на фоне ОС относится применение антиоксидантов [3, 68—72, 78—80]. Обоснованием лечения

бесплодных мужчин пероральными антиоксидантами является предположение, что семенной ОС вызывается частично дефицитом антиоксидантов спермы. Практика назначения пероральных антиоксидантов поддерживается отсутствием серьезных побочных эффектов, связанных с антиоксидантной терапией, хотя некоторые исследователи [81] тщательно оценивали риски передозировки антиоксидантами. В идеале, пероральный антиоксидант должен достигать высоких концентраций в половых путях и восполнять дефицит жизненно важных элементов, необходимых для сперматогенеза. Тем не менее уровень АФК в сперме не должен быть полностью подавлен под действием пероральных антиоксидантов, поскольку это может ухудшить нормальные функции спермы (например, капацитация спермы и гиперактивация), которым обычно требуется низкий уровень АФК [82, 83].

До настоящего времени более чем в 100 клинических и экспериментальных исследованиях изучали воздействие антиоксидантов на параметры семенной жидкости. Наиболее часто изучаемые пероральные антиоксиданты включают витамины С и Е, селен, цинк, глутатион, фолиевую кислоту, L-карнитин и N-ацетилцистеин; рандомизированные контролируемые исследования антиоксидантной терапии мужского бесплодия обычно указывают на то, что лечение антиоксидантами дает благоприятный эффект (с точки зрения улучшения параметров семенной жидкости), в то время как не отмечается значительного эффекта в группе плацебо [3, 68—72, 78—80]. Среди антиоксидантов, представленных на российском фармацевтическом рынке, можно отметить препарат Селцинк плюс (селен — 0,05 мг, цинк — 7,7 мг, витамин Е — 31,5, витамин С — 180 мг, В-каротин — 4,8 мг). Он показал свою эффективность при нарушении фертильности у мужчин с хроническим простатитом IIIA в открытом сравнительном плацебо-контролируемом исследовании [84]. Антиоксидантная терапия обычно приводит к значительному улучшению целостности ДНК сперматозоидов, более адекватной упаковки на протаминах, меньшей выраженности признаков апоптоза гамет (annexin V и др.), в некоторых случаях — увеличению частоты наступления беременности после ВРТ [3, 68—72, 78—80]. При этом существенных изменений в параметрах рутинной спермы (концентрация, подвижность, морфология) и/или концентрации мужских половых гормонов может не быть [85].

Следует отметить, что цинк в отличие от прочих соединений-антиоксидантов в комплексе со специфическими белками непосредственно регулирует конденсацию хроматина сперматозоидов [86]; дефицит цинка, как показали экспериментальные исследования, приводит к апоптозу клеток яичка [87].

В небольшом пилотном исследовании показан положительный эффект рекомбинантного ФСГ при

идиопатическом бесплодии с повышенным уровнем фрагментации ДНК; при этом отмечена отрицательная корреляция эффекта с уровнем ROS [88]. Сегодня принято считать, что стимуляция sustentоцитов (клеток Сертоли) гормоном ФСГ — условие ингибирования апоптоза диплоидных сперматогоний, признаком чего является интактная ДНК, сохранение их жизнеспособности и вхождения в мейоз [89, 90].

Четвертый этап — *совершенствование методов выделения и обработки сперматозоидов in vitro* для последующего ЭКО. Сравнение различных методов подготовки спермы доказывает, что наиболее эффективным методом элиминации неживых и апоптотических сперматозоидов является процедура swim-up [91, 92]. Для предотвращения ОС, связанного с процедурой центрифугирования, активацией лейкоцитов на фоне удаления семенной плазмы (обладающей антиоксидантной активностью), применяют антиоксиданты *in vitro*: витамин Е, каталаза и глутатион защищают сперматозоид от воздействий экзогенных АФК [93—95]. В отличие от благоприятного эффекта антиоксидантов в отношении защиты сперматозоидов от экзогенных АФК антиоксиданты, по всей видимости, имеют ограниченную ценность с точки зрения защиты сперматозоидов от выработки эндогенных АФК, продуцируемых митохондриями сперматозоидов при их спонтанном апоптозе [3].

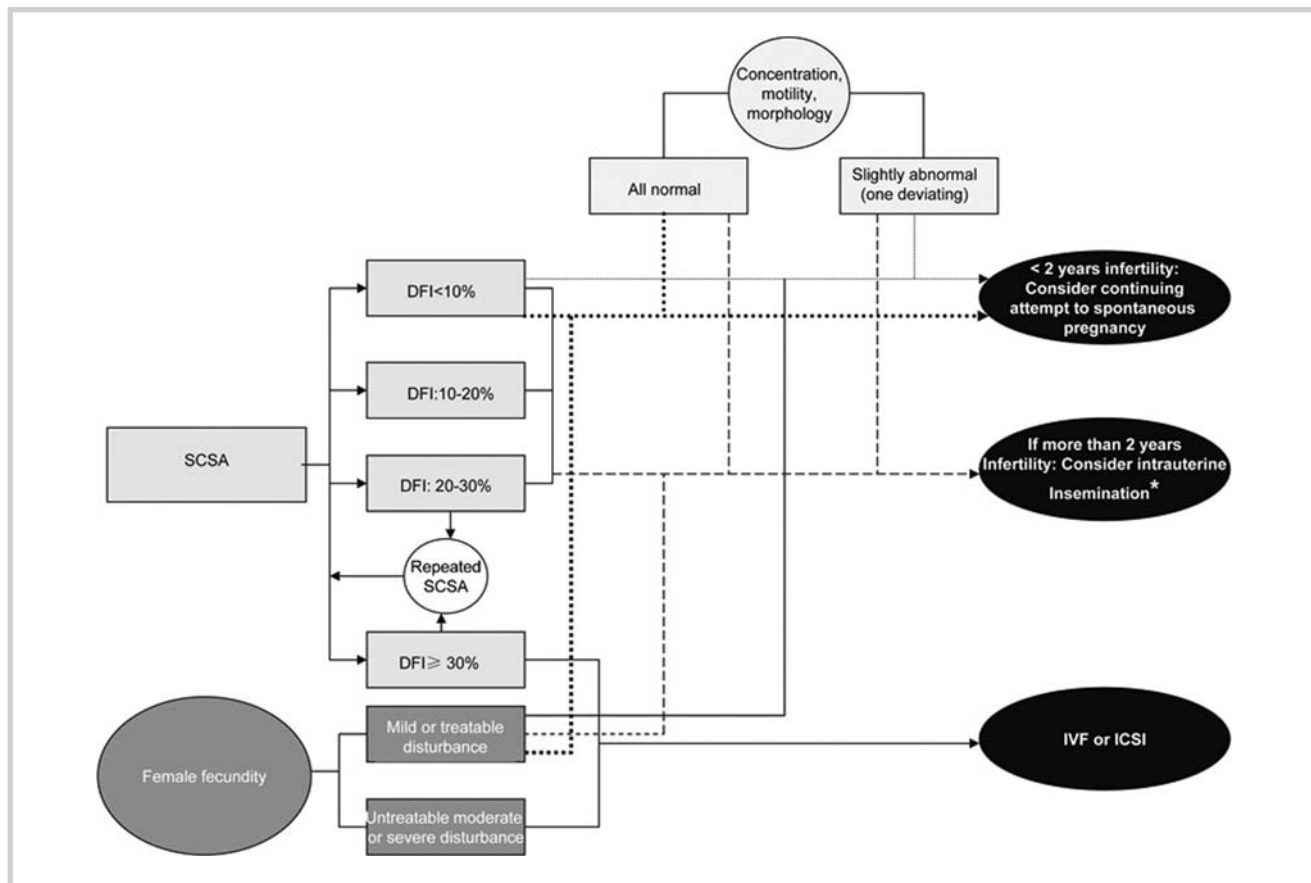
Последние годы обсуждается возможность использования для отбора качественных сперматозоидов для ИКСИ оптических систем высокого разрешения (MSOME), позволяющих обнаруживать в цитоплазме вакуоли, которые считают признаками генетических аномалий и/или незавершенного апоптоза гамет [42]. Некоторые работы [2, 40] свидетельствуют, что при использовании для ИКСИ сперматозоидов без вакуолизации цитоплазмы эффективность ЭКО ИКСИ выше, некоторые исследования [43] это не подтверждают.

Снизить высокие показатели фрагментации ДНК возможно с помощью применения в протоколах ИКСИ тестикулярных сперматозоидов. При азооспермии было показано, что тестикулярные сперматозоиды имеют менее поврежденные хромосомы [96, 97].

Обобщая клинический и эмбриологический материал, М. Bungum и соавт. [25] предложили алгоритм ведения пары с аномалиями хромосом сперматозоидов, учитывающий анамнез бесплодия, состояние репродуктивного здоровья женщины и данные исследования на фрагментацию ДНК (рисунок).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка структурных нарушений сперматозоидов имеет самостоятельное диагностическое и прогностическое значение для пациентов с мужским фактором бесплодия, в том числе при использовании методов ВРТ. Исследование фрагментации ДНК спер-



Алгоритм помощи парам с мужским фактором бездетного брака (по М. Vungum и соавт., 2011)

матозоидов и определение соотношения гистон/протамин должны служить дополнением к рутинному анализу спермы и являться прогностическим критерием для определения возможных неудач программ ВРТ.

Снижение высокого уровня фрагментации ДНК сперматозоидов с помощью андрологических и эмбриологических методов поможет преодолеть обусловленный им мужской фактор бесплодия и невынашивания беременности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen. 5th ed. Prepublication Version 2010.
2. de Almeida Ferreira Braga D.P., Setti A.S., Figueira R.C. et al. Sperm organelle morphologic abnormalities: contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes. *Urology* 2011; 78: 4: 786–791.
3. Zini A., Al-Hathal N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? *Asian J Androl* 2011; 13: 3: 374–381.
4. Beshay V.E., Bukulmez O. Sperm DNA damage: how relevant is it clinically? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012; 24: 3: 172–179.
5. Govin J., Caron C., Lestrat C. et al. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 2004; 271: 3459–3469.
6. Sakkas D., Alvarez J.G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; 93: 4: 1027–1036.
7. Oliva R., Castillo J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J Androl* 2011; 13: 1: 24–30.
8. Evenson D.P., Larson K.L., Jost L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25–43.
9. Agarwal A., Said T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 4: 331–345.
10. Kempisty B., Depa-Martynow M., Lianeri M. et al. Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45: Suppl 1: S109–S113.
11. Erenpreiss J., Spano M., Erenpreisa J. et al. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006; 8: 1: 11–29.
12. 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.
13. Benchaib M., Braun V., Lornage J. et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003; 18: 5: 1023–1028.
14. Robinson L., Gallos I.D., Conner S.J. et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and metaanalysis. *Hum Reprod* 2012.
15. Tomsu M., Sharma V., Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod* 2002; 17: 7: 1856–1862.

16. *Dada R., Mahfouz R.Z., Kumar R. et al.* A comprehensive work up for an asthenozoospermic man with repeated intracytoplasmic sperm injection (ICSI) failure. *Andrologia* 2011; 43: 5: 368—372.
17. *Simon L., Castillo J., Oliva R. et al.* Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online* 2011; 23: 6: 724—734.
18. *Bungum M., Humaidan P., Spano M. et al.* The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004; 19: 1401—1408.
19. *Simon L., Lutton D., McManus J. et al.* Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril* 2011; 95: 2: 652—657.
20. *Carrell D.T., Liu L., Peterson C.M. et al.* Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 2003; 49: 49—55.
21. *Kennedy C., Ahlering P., Rodriguez H. et al.* Sperm chromatin structure correlates with spontaneous abortion and multiple pregnancy rates in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2011; 22: 3: 272—276.
22. *Evenson D.P., Jost L.K., Marshall D. et al.* Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039—1049.
23. *Zini A., Boman J., Belzile E. et al.* Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and metaanalysis. *Hum Reprod* 2008; 23: 12: 2663—2668.
24. *Collins J.A., Barnhart K.T., Schlegel P.N.* Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008; 89: 823—831.
25. *Bungum M., Bungum L., Giwercman A.* Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl* 2011; 13: 1: 69—75.
26. *Sadeghi M.R., Lakpour N., Heidari-Vala H. et al.* Relationship between sperm chromatin status and ICSI outcome in men with obstructive azoospermia and unexplained infertile normozoospermia. *Rom J Morphol Embryol* 2011; 52: 2: 645—651.
27. *Sharbatoghli M., Valojerdi M.R., Amanlou M. et al.* Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane potential with semen parameters and ART outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Arch Gynecol Obstet* 2012.
28. *Barratt C.L., Aitken R.J., Bjorndahl L. et al.* Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications — a position report. *Hum Reprod* 2010; 25: 4: 824—838.
29. *Zini A.* Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Syst Biol Reprod Med* 2011; 57: 1—2: 78—85.
30. *Zini A., Meriano J., Kader K. et al.* Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum Reprod* 2005; 20: 12: 3476—3480.
31. *Hammadeh M.E., al-Hasani S., Stieber M. et al.* The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod* 1996; 11: 11: 2468—2471.
32. *Oliva R.* Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 4: 417—435.
33. *Cho C., Jung-Ha H., Willis W.D. et al.* Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 2003; 69: 1: 211—217.
34. *Sakkas D., Urner F., Bizzaro D. et al.* Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 1998; 13: Suppl 4: 11—19.
35. *Irvine D.S., Twigg J.P., Gordon E.L. et al.* DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000; 21: 33—44.
36. *Mantas D., Angelopoulou R., Msaouel P. et al.* Evaluation of sperm chromatin quality and screening of Y chromosome microdeletions in Greek males with severe oligo-zoospermia. *Arch Androl* 2007; 53: 5—8.
37. *Virro M.R., Larson-Cook K.L., Evenson D.P.* Sperm chromatin structure assay (scsa) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004; 81: 1289—1295.
38. *Cho C., Willis W.D., Goulding E.H. et al.* Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 2001; 28: 1: 82—86.
39. *Ozmen B., Koutlaki N., Youssry M. et al.* DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 3: 384—395.
40. *Malgorzata K., Depa-Martynow M., Butowska W. et al.* Human spermatozoa ultrastructure assessment in the infertility treatment by assisted reproduction technique. *Arch Androl* 2007; 53: 6: 297—302.
41. *Perdrix A., Trovers A., Chelli M.H. et al.* Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum Reprod* 2011; 26: 1: 47—58.
42. *Franco J.G.Jr., Mauri A.L., Petersen C.G. et al.* Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. *Int J Androl* 2012; 35: 1: 46—51.
43. *Watanabe S., Tanaka A., Fujii S. et al.* An investigation of the potential effect of vacuoles in human sperm on DNA damage using a chromosome assay and the TUNEL assay. *Hum Reprod* 2011; 26: 5: 978—986.
44. *Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А., Курило Л.Ф. и соавт.* Электронно-микроскопическое изучение сперматозоидов и его роль в диагностике мужского бесплодия. *Пробл репрод* 2000; 6: 6: 62—71.
45. *Gandini L., Lombardo F., Paoli D. et al.* Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 4: 830—839.
46. *Oosterhuis G.J., Mulder A.B., Kalsbeek-Batenburg E. et al.* Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000; 74: 2: 245—250.
47. *Giwercman A., Richthoff J., Hjiullund H. et al.* Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril* 2003; 80: 6: 1404—1412.
48. *Chi H.J., Chung D.Y., Choi S.Y. et al.* Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. *Clin Exp Reprod Med* 2011; 38: 1: 10—17.
49. *Tang S.S., Gao H., Zhao Y. et al.* Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. *Int J Androl* 2010; 33: 1: 163—179.
50. *Zini A., Sigman M.* Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 2009; 30: 219—229.
51. *Ricci G., Perticarari S., Fragonas E. et al.* Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod* 2002; 17: 10: 2665—2672.
52. *Cohen-Bacrie P., Belloc S., Menezo Y.J. et al.* Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril* 2009; 91: 5: 1801—1805.
53. *Lopes S., Sun J.G., Jurisicova A. et al.* Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 528—532.
54. *Avendano C., Oehninger S.* DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? *J Androl* 2011; 32: 4: 356—363.
55. *Avendano C., Franchi A., Duran H. et al.* DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 2010; 94: 2: 549—557.



56. *Genesca A., Caballin M.R., Miro R. et al.* Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet* 1992; 89: 181–186.
57. *Meseguer M., Santiso R., Garrido N., et al.* Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril* 2011; 95: 1: 124–128.
58. *Schulte R.T., Ohl D.A., Sigman M. et al.* Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Ass Reprod Genet* 2010; 27: 1: 3–12.
59. *Christopher L.R. Barrattl R., Aitken J. et al.* Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications — a position report. *Human Reprod* ; 25: Issue 4: 824–838.
60. *Aitken R.J., Krausz C.* Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122: 497–506.
61. *Aitken R.J., Findlay J.K. et al.* Apoptosis in the germ line. *Reproduction* 2011; 141: 2: 139–150.
62. *Tavalaee M., Nasr-Esfani M.H.* Etiology and evaluation of sperm chromatin anomalies. *Int J Fertil Steril* 2008; 2: 1: 1–8.
63. *Enciso M., Pieczenik G., Cohen J. et al.* Development of a novel synthetic oligopeptide for the detection of DNA damage in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2012.
64. *Seli E., Sakkas D.* Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 4: 337–349.
65. *Delbes G., Hales B.F., Robaire B.* Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 1: 14–22.
66. *Tu H.Y., Zini A.* Finasteride-induced secondary infertility associated with sperm DNA damage. *Fertil Steril* 2011; 95: 6: 2125:e13–e14.
67. *Muciaccia B., Pensini S., Culasso F. et al.* Higher clusterin immunolabeling and sperm NA damage levels in hypertensive men compared with controls. *Hum Reprod* 2012.
68. *Tremellen K.* Oxidative stress and male infertility — a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 243–258.
69. *Lombardo F., Sansone A., Romanelli F. et al.* The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: an overview. *Asian J Androl* 2011; 13: 690–697.
70. *De Jullis G.N., Thomson L.K., Mitchell L.A. et al.* DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 2009; 81: 517–524.
71. *Showell M.G., Brown J., Yazdani A. et al.* Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 1: CD007411.
72. *Божедомов В.А., Громенко Д.С., Ушакова И. В. и др.* Оксидативный стресс сперматозоидов в патогенезе мужского бесплодия. *Урология* 2009; 2: 51–56.
73. *Chen S.S., Huang W.J., Chang L.S. et al.* Attenuation of oxidative stress after varicocelelectomy in subfertile patients with varicocele. *J Urol* 2008; 179: 2: 639–642.
74. *Sadek A., Almohamdy A.S., Zaki A. et al.* Sperm chromatin condensation in infertile men with varicocele before and after surgical repair. *Fertil Steril* 2011; 95: 5: 1705–1708.
75. *Zini A., Azhar R., Baazeem A. et al.* Effect of microsurgical varicocelelectomy on human sperm chromatin and DNA integrity: a prospective trial. *Int J Androl* 2011; 34: 1: 14–19.
76. *Gallegos G., Ramos B., Santiso R. et al.* Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertil Steril* 2008; 90: 2: 328–334.
77. *Божедомов В.А., Громенко Д.С., Ушакова И.В. и др.* Причины оксидативного стресса сперматозоидов. *Пробл репрод* 2008; 6: 67–73.
78. *Gharagozloo P., Aitken R.J.* The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 2011; 26: 7: 1628–1640.
79. *Agarwal A., Nallala K.P., Allamaneni S.S. et al.* Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 616–627.
80. *Lanzafame F.M., La Vignera S., Vicari E. et al.* Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2009; 19: 5: 638–659.
81. *Henkel R.R.* Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl* 2011; 13: 43–52.
82. *Aitken R.J., Paterson M., Fisher H. et al.* Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 1995; 108: Pt 5: 2017–2025.
83. *de Lamirande E., Jiang H., Zini A. et al.* Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997; 2: 48–54.
84. *Сивков А.В., Ощепков В.Н., Евдокимов В.В. и др.* Применение препарата Селцинк Плюс у больных хроническим неинфекционным простатитом и нарушениями фертильности. *Урология* 2011; 5: 27–32.
85. *Tunc O., Thompson J., Tremellen K.* Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. *Reprod Biomed Online* 2009; 18: 761–768.
86. *Mogielnicka-Brzozowska M., Kordan W.* Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. *Pol J Vet Sci* 2011; 14: 3: 489–499.
87. *Kumari D., Nair N., Bedwal R.S.* Testicular apoptosis after dietary zinc deficiency: ultrastructural and TUNEL studies. *Syst Biol Reprod Med* 2011; 57: 5: 233–243.
88. *Palomba S., Falbo A., Espinola S. et al.* Effects of highly purified FSH on sperm DNA damage in men with male idiopathic subfertility: a pilot study. *J Endocrinol Inv* 2011; 34: 10: 747–752.
89. *Sa R., Neves R., Fernandes S. et al.* Cytological and expression studies and quantitative analysis of the temporal and stage-specific effects of follicle-stimulating hormone and testosterone during co-cultures of the normal human seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 2008; 79: 5: 962–975.
90. *Ruwanpura S.M., McLachlan R.I., Matthiesson K.L. et al.* Gonadotrophins regulate germ cell survival, not proliferation, in normal adult men. *Hum Reprod* 2008; 23: 2: 403–411.
91. *Zini A., Finelli A., Phang D., Jarvi K.* Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology* 2000; 56: 1081–1084.
92. *Younglai E.V., Holt D., Brown P. et al.* Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1950–1953.
93. *de Lamirande E., Gagnon C.* Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 1992; 13: 368–378.
94. *Aitken R.J., Buckingham D., Harkiss D.* Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 441–450.
95. *Moubasher A.E., El Din A.M., Ali M.E. et al.* Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Andrologia* 2012.
96. *Greco E., Scarselli F., Iacobelli M. et al.* Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2004; 20: 1: 226–230.
97. *Aguilar C., Meseguer M., Garcia-Herrero S. et al.* Relevance of testicular sperm DNA oxidation for the outcome of ovum donation cycles. *Fertil Steril* 2010; 94: 3: 979–988.