



у

Юс

е

1. Фофанова И.Ю. Современные поливитаминные препараты (обзор литературы) / Патологи б
2. Николаев В.В., Строев В.А., Астраханцев А.Ф. Биохимические исследования сперматозоидов / Патология и нефрология. 1993. № 3. С.33–36.
3. Combs GF Jr, Clark LC, Turnbull BW. An analysis of cancer prevention by selenium // Biofactors. 2001. – –
4. Clark L.C., Combs G.F., Turnbull B.W. The nutritional prevention of cancer with selenium 1983–1993: A randomized clinical trial // JAMA, 1996. Vol. 276. P. 1957–1963.
5. Анисимов В.Н. Современные

Роль структурных нарушений хроматина и ДНК сперматозоидов в развитии бесплодия

В.А. Божедомов^{1,2,3}, Н.А. Липатова¹, Е.А. Спориш³, И.М. Рохликов¹, И.В. Виноградов³

¹Кафедра клинической андрологии ФПК МР ГБОУ ВПО РУДН, Москва;

²кафедра акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии ФППОВ ГБОУ ВПО

«Первый МГМУ им И.М. Сеченова» Минздрава России;

³ФГБУ Поликлиника № 1 УДП РФ, Москва

Контакты: Владимир Александрович Божедомов VBojedomov@mail.ru

Выполнен анализ публикаций о роли структурных нарушений хроматина в развитии бесплодия. Показано, что изменения соотношения гистоны/протамины в структуре хроматина, нарушения упаковки и возникновение разрывов (фрагментация) ДНК сопровождаются увеличением риска развития аномалий зародыша и невынашивания беременности. Ведущей экзогенной причиной повышенной фрагментации ДНК является оксидативный стресс. Охарактеризованы факторы риска оксидативного стресса. Рассмотрены пути коррекции данных нарушений: устранение этиологических факторов и применение антиоксидантов.

Ключевые слова: аномалии структуры хроматина, фрагментация ДНК, сперматозоиды, ремоделирование, бесплодие, невынашивание беременности, повреждающие факторы, оксидативный стресс

The role of structural abnormalities of sperm chromatin and DNA in the development of infertility

V.A. Bojedomov^{1,2,3}, N.A. Lipatova¹, E.A. Sporish³, I.M. Rokhlikov¹, I.V. Vinogradov³

¹Department of Clinical Andrology, Faculty for Advanced Training of Health Care Workers, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow;

²Department of Obstetrics, Gynecology, Perinatology, and Reproductology, Faculty for Postgraduate Professional Training of Physicians, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia;

³Polyclinic № 1, Administrative Department of the President of the Russian Federation, Moscow

The paper analyzes publications on the role of chromatin structural abnormalities in the development of infertility. The altered histone/protamine ratio in the chromatin structure, impaired packages of DNA and the occurrence of its breaks (fragmentation) are followed by a higher risk for fetal abnormalities and miscarriage. Oxidative stress is the leading exogenous cause of increased DNA fragmentation. The risk factors of oxidative stress are characterized. The ways to correct these disorders, namely to eliminate etiological factors and to use antioxidants, are considered.

Key words: chromatin structural abnormalities, DNA fragmentations, spermatozoa, remodeling, infertility, miscarriage, damaging factors, oxidative stress

Снижение фертильности мужчин обусловлено недостаточным количеством сперматозоидов и/или их плохим качеством. Сокращение требований к количественным показателям спермограммы в последней 5-й редакции руководства ВОЗ по исследованию спермы отражает, в том числе, признание ведущей роли функциональных нарушений сперматозоидов при бесплодии [1].

Последние годы в качестве лабораторного критерия нормальной репродуктивной функции мужчины стали применять оценку структурных нарушений хроматина сперматозоидов: его адекватной упаковки и наличия 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 постепенной замены белков-гистонов, характерных для всех типов соматических клеток организма, на специальные переходные белки и протамины. Этот процесс начинается в мейозе и продолжается до выхода сперматозоидов из придатка. При ремоделировании гистоны сначала заменяются на специфические транзитные белки, которые в дальнейшем заменяются на протамины – основные, богатые аргинином белки. Пусковым механизмом к такой замене белков служит модификация гистонов: специфическое метилирование, ацетилирование, фосфорилирование или убиквитинилирование [5, 6]. В норме по завершению сперматогенеза и созревания сперматозоидов (у человека) протамины составляют не менее 85 % белков нуклеосом (рис. 1) [7].

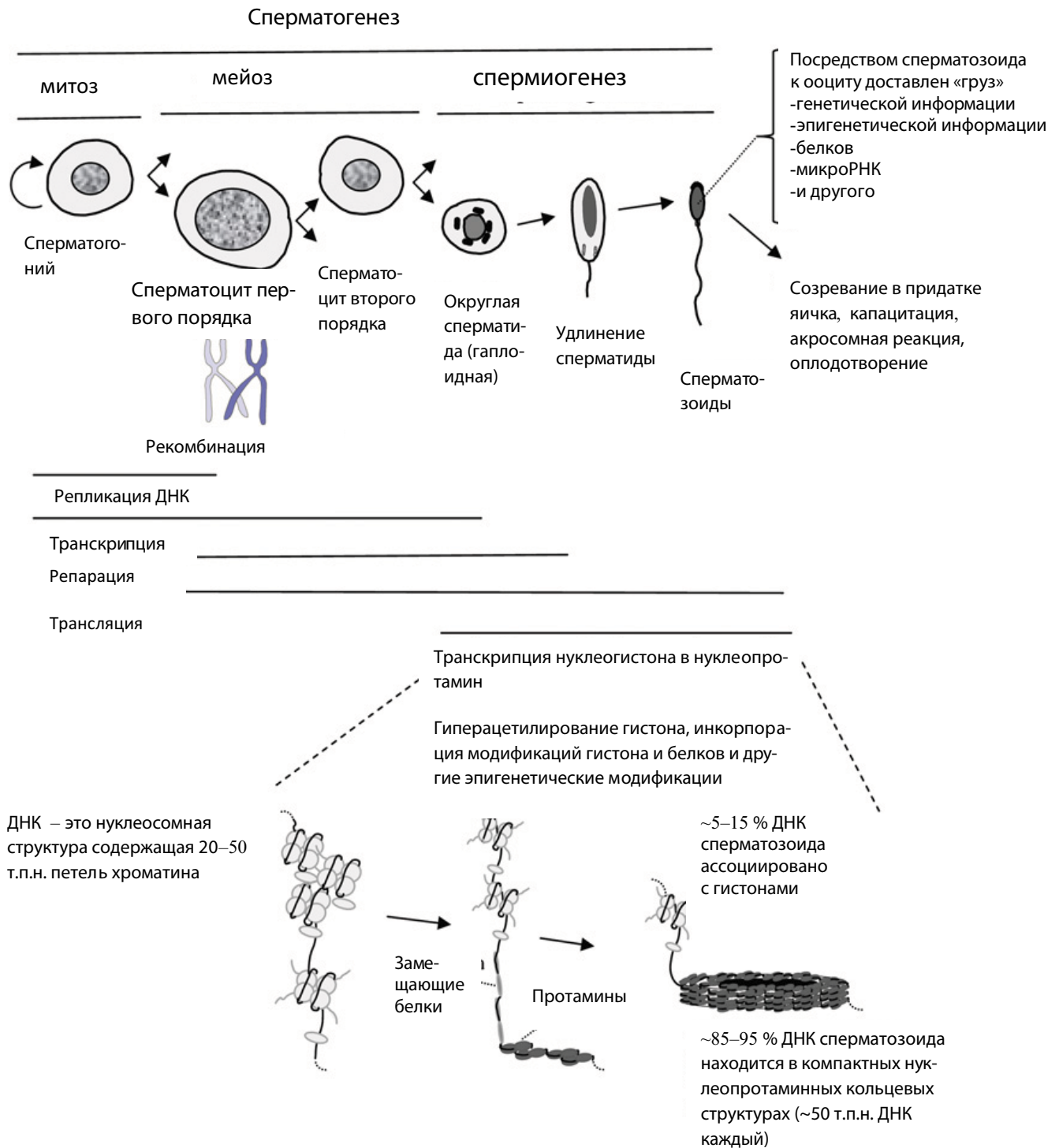


Рис. 1. Изменение упаковки хроматина в процессе сперматогенеза (no R. Oliva, J. Castillo, 2011) [7]

Какие-либо аномалии в структуре хроматина и целостности ДНК могут привести к нарушению оплодотворения и развития зародыша. Существуют несколько различных уровней аномалии хроматина сперматозоидов, имеющих значение для данного обсуждения: 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 аномалии хроматина сперматозоидов в нарушениях репродуктивной функции.

Влияние нарушений структуры хроматина сперматозоидов на фертильность

За последнее 10-летие во многих исследованиях установлен факт снижения фертильности, эффективности методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и повышения риска развития врожденных пороков при повышении 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 [20, 21]; предполагают, что до 40 % выкидышей может быть прогнозировано с помощью оценки целостности спермальной ДНК [22]. Выполненные несколько лет назад метаанализы опубликованных работ, посвященных роли фрагментации ДНК в нарушении фертильности, установили, что риск спонтанных аборт и нарушений развития зародыша после экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и интрацитоплазматической (внутриклеточная) инъекции сперматозоида (ИКСИ) увеличивается в 2,5 раза при более чем 30 % сперматозоидов с разрывами ДНК [23], и что нет различий при использовании стандартного протокола ЭКО и ИКСИ [24]. Согласно последним исследованиям, повышение частоты спонтанных аборт после ЭКО и ИКСИ происходит при частоте 20 % сперматозоидов с фрагментацией ДНК, причем в случаях при более чем 30 % сперматозоидов с фрагментацией ДНК риск спонтанного аборта возрастает более чем в 20 раз [25]. В то же время имеются исследования, авторы которых не обнаружили значимой взаимосвязи между фрагментацией ДНК и результатами оплодотворения/состояния зародыша после ИКСИ [26, 27]. V.E. Beshay и O. Bukulmez, авторы опубликованного последнего обзора «Sperm DNA damage: how relevant is it clinically?», соглашаются с мнением большинства коллег о том, что фрагментация ДНК сперматозоидов ассоциируется с более низкой частотой сохранения беременности при естественном зачатии и внутриматочной инсеминации, но полагают, что вряд ли это влияет на результаты ИКСИ, и сетуют, что существующие методы оценки фрагментации ДНК предоставляют мало конкретной 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 [28, 29]. Од-

ним из направлений при этом следует считать оценку фрагментации ДНК-образцов спермы, обработанных *in vitro* для ЭКО; по некоторым данным, пороговое значение фрагментации ДНК сперматозоидов при этом составляет 42 % (ОР 24,18; 95 % ДИ 2,89–522,34) [19].

Данные о влиянии нарушений соотношения между гистонами и протаминами в хроматине сперматозоидов менее очевидны. В ряде исследований не обнаружили существенной корреляции между дефицитом протаминов, с одной стороны, и нарушениями оплодотворения, качеством эмбрионов и результатами ЭКО и ИКСИ, с другой [30, 31]. В остальных было показано, что дефицит протаминов и увеличение доли гистонов ведет к преждевременной конденсации хроматина в сперматозоидах, что является причиной сбоя в оплодотворении и развитии эмбриона [17, 32–34]. Некоторые авторы [35, 36] отмечают наличие прямой корреляции между повышенным количеством сперматозоидов с фрагментацией ДНК и содержанием сперматозоидов с аномальной упаковкой хроматина, другие [37] считают, что популяция незрелых сперматозоидов не ассоциирована с повышенной частотой фрагментации ДНК. Предполагают, что уменьшение доли протаминов делает хроматин более чувствительным к повреждающим воздействиям [38]. Значимой разницей в состоянии зародышей между группами можно считать величину выше 30 % аномальных сперматозоидов по белковому составу хроматина [39].

Вопрос о пространственной структуре хроматина сперматозоидов в аспекте фертильности изучен менее всего. Имеются косвенные данные о том, 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 подсадки эмбриона [2, 40, 41]. Недавние исследования J.G. Franco et al. показали положительную взаимосвязь между нарушениями упаковки хроматина, содержанием протаминов и присутствием большой ядерной вакуоли в сперматозоидах [42]. Но в сходном исследовании S. Watanabe et al. не обнаружили взаимосвязи между наличием крупных вакуолей, с одной стороны, и нарушениями структуры хроматина и фрагментацией ДНК сперматозоидов, с другой [43]. Для описания аномальной конденсации хроматина сперматозоидов при ЭМИС некоторые отечественные исследователи используют термин «незрелый хроматин», что характеризуется наличием грубогранулярного и фибриллярного компонентов нуклеоплазмы, обычно характерного для удлинённых сперматид [44].

Не до конца ясно, как взаимосвязаны аномалии хроматина с показателями стандартной спермограммы: концентрацией, подвижностью, морфологией

сперматозоидов. Предполагают, что апоптоз, признаком 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 констатируют, что величина фрагментации ДНК не всегда связана с параметрами спермограммы [51, 52] – сперматозоид, морфологически расцененный как «нормальный», может иметь поврежденную ДНК [13, 53, 54]. Более того, по мнению некоторых авторов, фрагментация ДНК морфологически нормальных сперматозоидов оказывает особо негативное влияние на качество эмбрионов и результаты циклов ИКСИ [55].

Поскольку появление разрывов в структуре ДНК при репликации – неизбежный процесс в период сперматогенеза, в норме существуют механизмы биологического «ремонта» (восстановления) мужского генома. Имеются данные о том, что яйцеклетка в определенной степени способна восстанавливать повреждение ДНК оплодотворившего ее сперматозоида [56, 57]. Однако, когда повреждение ДНК спермато-

зоида 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.J. Aitken и С. Krausz предположили, что попытки неэффективной репарации спермальной ДНК яйцеклеткой могут вызывать мутагенный эффект, приводящий к врожденным аномалиям развития и опухолям у детей [60].

Схематически влияние повреждений ДНК сперматозоидов на репродуктивную функцию и здоровье ребенка отражены на рис. 2 [61].

Методы исследования нарушений структуры хроматина

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

Недавно предложен новый метод детекции повреждения ДНК сперматозоидов, основанный на применении синтетического пептида, состоящего из 21 аминокислоты (DW1), связанного флуоресцентным красителем Rhodamine В в взаимодействующего с критическим регионом p53 [63]. Хотя DW1 в на-



Рис. 2. Влияние фрагментации ДНК сперматозоидов на фертильность (по R.J. Aitken et al., 2011) [61]

Таблица 1. Методы анализа структуры хроматина сперматозоидов (по M. Tavalae et al., 2008, с исправлениями и добавлениями)

Метод	Принцип	Метод детекции	Основные преимущества	Основные недостатки
TUNEL	единичные и двойные разрывы нити ДНК	флуоресцентная 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	флуоресцентная 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 деспирализации ДНК	флуоресцентная микроскопия / оптическая микроскопия	сопоставим с тестом SCSA; недорогой, простой в исполнении	клиническая значимость метода уточняется
СМА3	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 двуцепочечных ДНК	флуоресцентная 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

стоящее время требует удаления оболочки с использованием детергента, дальнейшее совершенствование метода, по мнению авторов, позволит использовать его в программе ИКСИ для отбора жизнеспособных сперматозоидов с неповрежденной ДНК.

Отсутствие консенсуса при определении клинически значимых стандартов определения фрагментации ДНК и значимых пороговых уровней создает проблемы в осуществлении рутинного применения оценки целостности ДНК сперматозоидов в повседневной практике [1, 25].

Причины структурных нарушений ДНК сперматозоидов

После завершения упаковки хроматина на завершающих стадиях сперматогенеза большая часть ДНК сперматозоидов человека 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, электромаг-

Таблица 2. Эффекты отдельных химических и физических факторов на качество хромосом сперматозоидов и потенциальные механизмы этого влияния (по G. Delbès et al., 2010, с добавлениями)

Факторы	Качество спермы	Вид	Методы	Механизм	Литература
Облучение	анеуплоидия	мыши	FISH		Sailer et al., 1995
	аномальная структура хроматина	мыши	SCSA		
	разрывы цепочки ДНК	мыши	COMET		Haines et al., 2002
	мутации	мыши	Tandem repeat assay		Yauk et al., 2002
Повышенная температура	аномальная структура хроматина	Мыши	SCSA		Paul et al., 2008
Химиотерапевтические вещества	анеуплоидия	человек	FISH		Tempest et al., 2008
	аномальная структура хроматина	человек	SCSA		O'Flaherty et al., 2009
	разрывы цепочки ДНК	человек	COMET/TUNEL		
	низкая частота замены гистонов протаминами	человек	CMA3		
	изменение профиля метилирования ДНК	крыса	RLGS и (--and) qAMP		не опубликовано (unpublished)
	изменение в белковом составе (протеоме) ядерного матрикса	крыса	2D gels		Codrington et al., 2007
Эстрадиол / генистеин	разрывы цепочки ДНК	человек	COMET	причина оксидативного стресса	Anderson et al., 2003
ПХДs/p (полихлорированные дифенилы), р'-ДДЕ (дихлордифенилдихлорэтилен)	аномальная структура хроматина	человек	SCSA		Kruger et al., 2008
	разрывы цепочки ДНК	человек	TUNEL		Stronati et al., 2006
Фталаты	единичные разрывы цепочки ДНК	человек	COMET assay	метаболиты окисления	Hauser et al., 2007
Свинец	аномальная структура хроматина	человек	SCSA	оксидативный стресс	Hsu et al., 2009
	низкая частота замены гистонов протаминами	человек	Proteomics	взаимодействие с протамином 2	Quintanilla-Vega et al., 2000
Железо		крыса	8-oxodG levels		Wellejus et al., 2000
Кадмий	фрагментация ДНК	крыса	DNA fragmentation assay		Manna et al., 2008
Загрязнение воздуха	мутации	мыши	Tandem repeat assay		Somers et al., 2002
	аномальная структура хроматина	человек	SCSA		Rubes et al., 2007

нитное излучение, некоторые химические вещества (диоксид, пестициды, формальдегиды и др.) [65]. Нерепарированные изменения в ДНК сперматогониев могут фиксироваться в виде мутаций после репликации. Механизмы прямой репарации азотистых оснований и эксцизионной репарации нуклеотидов характеризуются одно- и/или двуцепочечными разрывами полинуклеотидной цепи [66]. Апоптоз обеспечивает элиминацию клеток с нерепарированной ДНК [67].

В перечень причин повреждения ДНК сперматозоидов в последнее время включен низкодозированный финастерид [68], некоторые соматические заболевания, в том числе гипертоническая болезнь [69].

Выявлена взаимосвязь повреждений в ДНК и апоптотических маркеров с активными формами кислорода (АФК) и окислительным стрессом (ОС).

Причиной негативного воздействия АФК на ДНК сперматозоидов считается прямое действие активных радикалов на незащищенные протамины участки ДНК и опосредованная эндонуклеазами индукция апоптоза после повреждения клетки [3, 70, 71]. Признаком оксидативного повреждения сперматозоидов является появление особой окисленной формы ДНК – 8-hydroxy, 2' deoxyguanosine (8OHdG) (8-гидрокси, 2'-деоксигуанозин) [72].

По данным недавнего Кохрановского обзора [73], от 30 до 80 % мужчин субфертильны в результате повреждающего действия ОС на сперматозоиды; по нашим данным, около 40 % [74].

Факторами, приводящими к повреждению ДНК в результате ОС, считают:

- дефицит антиоксидантов в продуктах питания;
- чрезмерное потребление алкоголя;
- усиленное занятие спортом;
- избыточный вес;
- психологические стрессы;
- возраст;
- фталаты;
- курение;
- пестициды (типа линдана, метоксифлора), гербициды;
- диоксид серы, дизельные микрочастицы;
- кадмий и литий;
- излучение мобильного телефона;
- некоторые лекарственные препараты (циклофосфамиды, аспирин, парацетамол);
- простатит (бактериальный, абактериальный);
- хламидии, микоплазмы, уреаплазмы;
- патогенные вирусы: вирус простого герпеса, ВИЧ, гепатиты В и С;
- хронические инфекции (туберкулез, малярия, болезнь Чагаса);
- вазэктомия;
- варикоцеле;

- крипторхизм и орхипексия;
- перекрут яичка;
- диабет;
- почечная недостаточность: хроническая, гемодиализ, трансплантация почки;
- гемоглобинопатии (в том числе бета-талассемия);
- ятрогенные факторы (центрифугирование, криоконсервация);
- аутоиммунные реакции против сперматозоидов.

Преодоление бесплодия и невынашивания беременности, вызванных структурными нарушениями хроматина сперматозоидов

Первым этапом является изменение образа жизни и **устранение факторов риска**, приводящих к нарушениям структуры хроматина.

Второй этап – **этиотропное лечение** потенциально устранимых заболеваний: варикоцеле и инфекционно-воспалительных процессов дополнительных половых желез. Показано, что варикоцелэктомия может восстановить повреждения ДНК у мужчин с бесплодием и клиническим варикоцеле [75–77]. Лечение хронического бактериального простатита и урогенитальных инфекций, сопровождающихся повышением уровня АФК, приводит к снижению выраженности ОС, нормализации показателей спермограммы и фрагментации ДНК [78, 79]. Так же необходима оптимальная терапия системных заболеваний, приводящих к повреждению ДНК: диабета, гипертонии, почечной недостаточности.

Третий этап – **патогенетическое лечение**, в случаях, когда оно возможно. К патогенетически подтвержденному лечению при повышенной фрагментации ДНК на фоне ОС относится применение антиоксидантов [3, 70–74, 80–82]. Обоснование лечения мужчин с бесплодием пероральными антиоксидантами основано на предположении о том, что семенной ОС вызывается, частично, дефицитом антиоксидантов спермы. Практика назначения пероральных антиоксидантов поддерживается отсутствием серьезных побочных эффектов, связанных с антиоксидантной терапией, хотя в некоторых исследованиях тщательно оценивали риски передозировки антиоксидантами [83]. В идеале, пероральный антиоксидант должен достигать высоких концентраций в половых путях и восполнять дефицит жизненно важных элементов, необходимых для сперматогенеза. Тем не менее, уровни АФК в сперме не должны быть полностью подавлены под действием пероральных антиоксидантов, поскольку это может ухудшить нормальные функции спермы (например, капацитация спермы и гиперактивация), для которых обычно требуются низкие уровни АФК [84, 85].

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 оказывает благоприятный эффект (с точки зрения улучшения параметров семенной жидкости), в то время как не отмечается значительного эффекта в группе плацебо [3, 70–74, 80–82]. Среди антиоксидантов, представленных на российском фармацевтическом рынке, можно отметить препарат Селцинк плюс (селен – 0,05 мг, цинк – 7,2 мг, витамин Е – 31,5, витамин С – 180 мг, β-каротин – 4,8 мг). Он показал свою эффективность при нарушении фертильности у мужчин с хроническим простатитом IIIA в открытом сравнительном плацебоконтролируемом исследовании [86]. Антиоксидантная терапия обычно приводит к значительному улучшению целостности ДНК сперматозоидов, более адекватной упаковке ДНК протаминами, меньшей выраженности признаков апоптоза гамет (annexin V и др.), в некоторых случаях – к увеличению частоты наступления беременности после ВРТ [3, 70–74, 80–82]. При этом существенных изменений в традиционных параметрах спермы (концентрация, подвижность, морфология) и/или концентрации мужских половых гормонов может не быть [87].

Следует отметить, что цинк, в отличие от прочих соединений-антиоксидантов, в комплексе со специфическими белками непосредственно регулирует конденсацию хроматина сперматозоидов [88]; дефицит цинка, как показали экспериментальные исследования, приводит к апоптозу клеток яичка [89].

В небольшом пилотном исследовании показан положительный эффект рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) при идиопатическом бесплодии с повышенным уровнем фрагментации ДНК; при этом отмечена отрицательная корреляция эффекта от уровня ROS [90]. Сегодня принято считать, что стимуляция ФСГ суспензий (клеток Сертоли) – условие ингибирования апоптоза диплоидных сперматогониев, признаком чего является интактная ДНК, сохранение их жизнеспособности и вступления в мейоз [91, 92].

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 методика swim-up [93, 94]. 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 сперматозоиды от воздействий экзогенных АФК [95–97]. В отличие от благоприятного эффекта антиоксидантов с точки зрения 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 для отбора качественных сперматозоидов для ИКСИ обсуждается возможность использования оптических систем высокого разрешения (MSOME), позволяющих обнаруживать в цитоплазме вакуоли, которые считают признаками генетических аномалий и/или незавершенного апоптоза гамет [42]. Результаты некоторых работ свидетельствуют о том, что при использовании для ИКСИ сперматозоидов без вакуолизации цитоплазмы эффективность ЭКО – ИКСИ выше [2, 40], но в других исследованиях это не подтверждают [43].

Снизить высокие показатели фрагментации ДНК возможно с помощью применения в протоколах ИКСИ тестикулярных сперматозоидов. При азооспермии было показано, что тестикулярные сперматозоиды имеют менее поврежденный хроматин [98, 99].

Обобщая клинический и эмбриологический материал, M. Bungum et al. [25] предложили алгоритм ведения пары с аномалиями хроматина сперматозоидов, учитывающий анамнез бесплодия, состояние репродуктивного здоровья женщины и данные исследования по фрагментации ДНК (рис. 3).

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 сперматозоидов и соотношения гистонов/протаминов должны служить дополнением к рутинному анализу спермы и являться прогностическим критерием для определения возможных неудач программ ВРТ.

Снижение высокой частоты фрагментации ДНК сперматозоидов с помощью андрологических и эмбриологических методов поможет преодолеть обусловленный фрагментацией ДНК мужской фактор инфертильности.

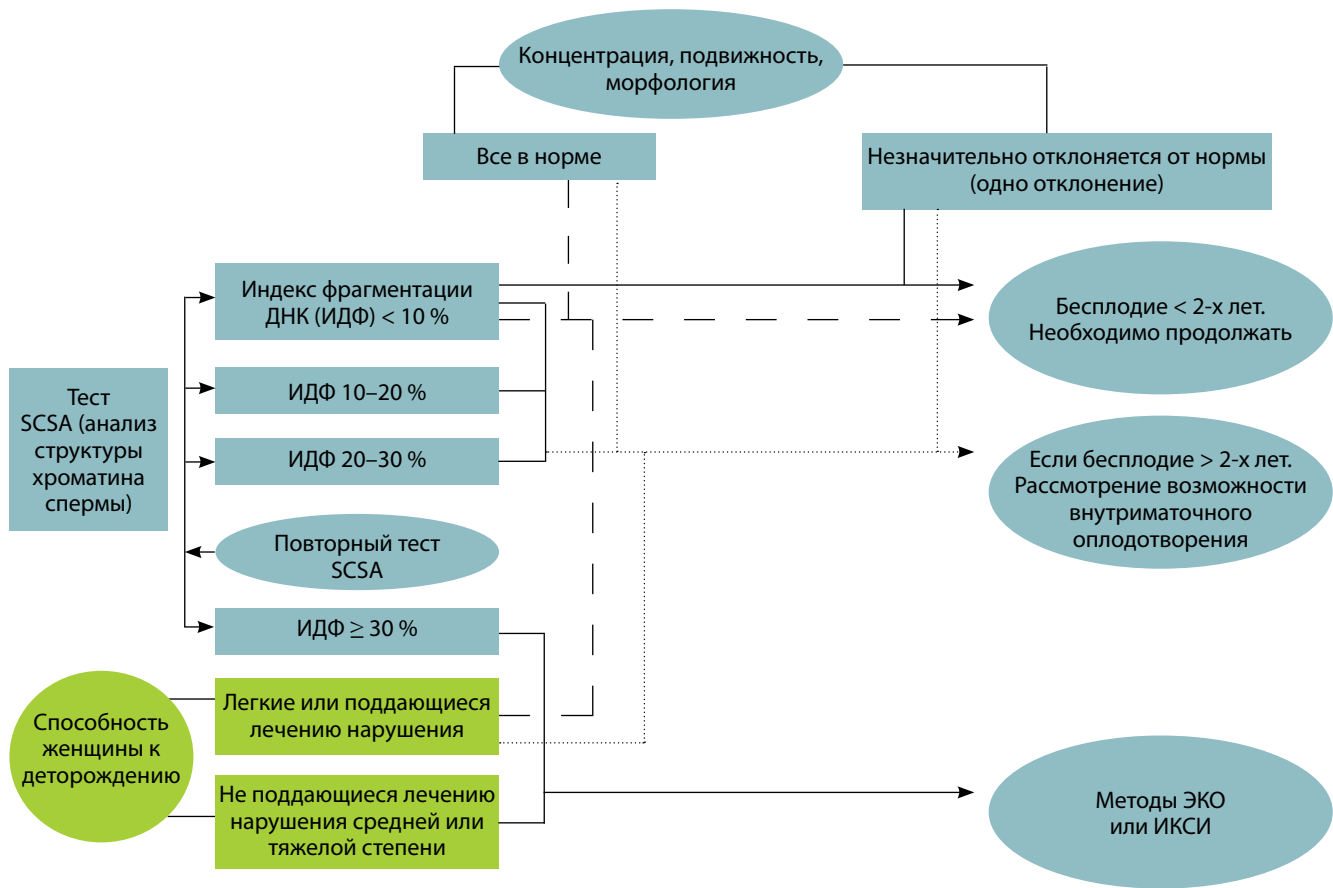


Рис. 3. Алгоритм помощи парам с мужским фактором бесплодия (по М. Bungum et al., 2011) [25]

ЛИТЕРАТУРА

- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen. 5th ed. Prepublication version, 2010.
- 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 Oct;78(4):786–91.
- Zini A., Al-Hathal N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? *Asian J Androl* 2011 May;13(3):374–81.
- Beshay V.E., Bukulmez O. Sperm DNA damage: how relevant is it clinically? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012 Jun;24(3):172–9.
- Govin J., Caron C., Lestrat C. et al. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 2004;271:3459–69.
- Sakkas D., Alvarez J.G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010 Mar 1;93(4):1027–36.
- Oliva R., Castillo J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J Androl* 2011 Jan;13(1):24–30.
- 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.
- Agarwal A., Said T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9(4):331–45.
- 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 1:109–13.
- Erenpreiss J., Spano M., Erenpreiss J. et al. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006;8(1):11–29.
- Tesarik J., Mendoza C., Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod* 2002;17:184–9.
- Benchaib M., Braun V., Lornage J. et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18:5:1023–8.
- Morris I.D., Ilott S., Dixon L. et al. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002;17:990–8.
- 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):1856–62.
- 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 Oct;43(5):368–72.
- Simon L., Castillo J., Oliva R. et al. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted