



Батуревич Л.В.✉, Шилейко И.Д., Алехнович Л.И., Коломиец А.О., Кузьменко А.Т.
Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

Значение индекса ДНК-фрагментации в диагностике мужской infertility

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Батуревич Л.В. – дизайн исследования, сбор материала, обработка, написание текста; Шилейко И.Д. – концепция, дизайн исследования, написание текста, литературный обзор; Алехнович Л.И. – написание текста, редактирование; Коломиец А.О. – дизайн исследования, сбор материала, обработка; Кузьменко А.Т. – написание текста, редактирование.

Подана: 21.02.2022
Принята: 07.03.2022
Контакты: cld@belmapo.by

Резюме

Введение. Фрагментация ДНК, отражая нарушение целостности генома сперматозоида, может служить важным диагностическим и прогностическим критерием оценки фертильности мужчин.

Цель. Установить клиничко-лабораторную значимость определения ДНК-фрагментации сперматозоидов в качестве теста оценки фертильности эякулята мужчин, страдающих бесплодием.

Материалы и методы. Методами световой микроскопии у 105 мужчин с бесплодием осуществлено исследование спермограммы и степени выраженности ДНК-фрагментации сперматозоидов с использованием набора реагентов Halosperm G2.

Результаты. Установлена связь индекса фрагментации ДНК с подвижностью и жизнеспособностью сперматозоидов у infertile мужчин с олиго- и нормозооспермией.

Выводы. Полученные данные позволяют сделать вывод о целесообразности оценки фрагментации ДНК сперматозоидов у мужчин с олигозооспермией. Определение дисперсии хроматина может быть рекомендовано в качестве скринингового теста для оценки фертильности мужчины.

Ключевые слова: бесплодие, фрагментация ДНК, спермограмма, индекс фрагментации, индекс деградации



Baturevich L.✉, Shileiko I., Alehnovich L., Kolomiets A., Kuzmenko A.
Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

The Value of the DNA Fragmentation Index in the Diagnosis of Male Infertility

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Baturevich L. – research design, material collection, processing, text writing; Shileiko I. – concept, research design, text writing, literature review; Alehnovich L. – text writing, editing; Kolomiets A. – research design, material collection, processing; Kuzmenko A. – text writing, editing.

Submitted: 21.02.2022

Accepted: 07.03.2022

Contacts: cld@belmapo.by

Abstract

Introduction. DNA fragmentation, reflecting the violation of the integrity of the sperm genome, can serve as an important diagnostic and prognostic criterion for assessing male fertility.

Purpose. To establish the clinical and laboratory significance of determining the DNA fragmentation of spermatozoa as a test for assessing the fertility of the ejaculate of men suffering from infertility.

Materials and methods. Using light microscopy methods, 105 men with infertility studied the semen analysis and the severity of DNA fragmentation of spermatozoa using the Halosperm G2 reagent kit.

Results. The relationship between the DNA fragmentation index and the mobility and viability of spermatozoa in infertile men with oligo- and normozoospermia has been established.

Conclusions. The data obtained allow us to conclude that it is expedient to assess the DNA fragmentation of spermatozoa in men with oligozoospermia. The chromatin dispersion (SCD) method can be recommended as a screening test to assess male fertility.

Keywords: infertility, DNA fragmentation, spermogram, fragmentation index, degradation index

■ ВВЕДЕНИЕ

Нарушение репродуктивной функции является серьезной медицинской и социальной проблемой. По оценкам ВОЗ, примерно 15% пар обращаются за медицинской помощью по причине невозможности забеременеть на протяжении 12 месяцев регулярной половой жизни. От 20% до 50% всех случаев бесплодия в парах обусловлено нарушением репродуктивной функции мужчин [1, 2].

Основным лабораторным методом, позволяющим дать предварительную оценку фертильного потенциала мужчины, является спермиологическое исследование эякулята. На основании оценки количества, подвижности и морфологических особенностей сперматозоидов в эякуляте представляется возможным дать предварительную оценку фертильного статуса мужчины. Однако результаты исследования спермограммы не всегда позволяют дать полную оценку состояния фертильности

мужчины, поскольку на оплодотворяющую способность сперматозоидов влияет ряд факторов, таких как наличие анеуплоидий, состояние хроматина, строение жгутика, вирусное и бактериальное инфицирование, а также фрагментация ДНК [3].

Целостность цепочки ДНК сперматозоидов после оплодотворения рассматривается как один из основополагающих факторов нормального развития беременности. Известно, что нарушение целостности ДНК является индикатором повреждения клетки. Фрагментация представляет собой разрыв одной или двух нитей молекулы ДНК. Некоторое количество таких разрывов необходимо для нормального сперматогенеза, однако при различных нарушениях процесса созревания гамет степень повреждения ДНК может увеличиваться [2–4].

Повреждение генома сперматозоида может происходить как на этапе сперматогенеза и транзита по семявыносящим путям, так и после эякуляции. Среди причин, приводящих к возникновению разрывов в ДНК, выделяют: специфические изменения хроматина на разных этапах сперматогенеза; незавершенный в ходе сперматогенеза апоптоз; воздействие химио- и радиотерапии и других факторов окружающей среды. Многочисленными исследованиями установлена роль окислительного стресса в патогенезе ДНК-фрагментации сперматозоидов [2, 3, 5, 6].

Высокий уровень фрагментации ДНК может приводить не только к снижению вероятности самостоятельного зачатия в паре, но и к нарушениям эмбрионального развития, к повышению вероятности невынашивания беременности. Не исключается риск возникновения проблем в результате экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) [2, 4, 6–9].

В научной литературе имеются данные о некоторых исследованиях на предмет оценки взаимосвязи между основными параметрами сперматозоидов (концентрацией, подвижностью, морфологией) и коэффициентом фрагментации их ядерной ДНК. Отмечается, что изменения ряда параметров спермограммы могут коррелировать со степенью фрагментации ДНК в мужских гаметах. Например, при тяжелой степени олигозооспермии или при большом количестве морфологически аномальных сперматозоидов высока вероятность того, что уровень фрагментации ДНК в сперматозоидах будет повышен [3, 6].

Фрагментация ДНК, отражая нарушение целостности генома сперматозоида, может служить важным диагностическим и прогностическим критерием оценки фертильности мужчин. Точный анализ качества ДНК сперматозоидов, степень и динамика ее деградации дают важную информацию, дополняющую спермиологическое исследование.

В настоящее время в практике для определения фрагментации ДНК используется ряд методов [2]:

- Transferase mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) – метод, основанный на прямой маркировке разрывов ДНК флюорохромом и измерении интенсивности люминесценции;
- Cleaver Scientific Comet Assay (SCGE) – анализ одноклеточного гель-электрофореза, метод гель-электрофореза отдельных клеток или метод ДНК-комет (COMET);
- Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) – анализ структуры хроматина сперматозоида.

Однако эти методы требуют дорогостоящего оборудования и специально подготовленного персонала.

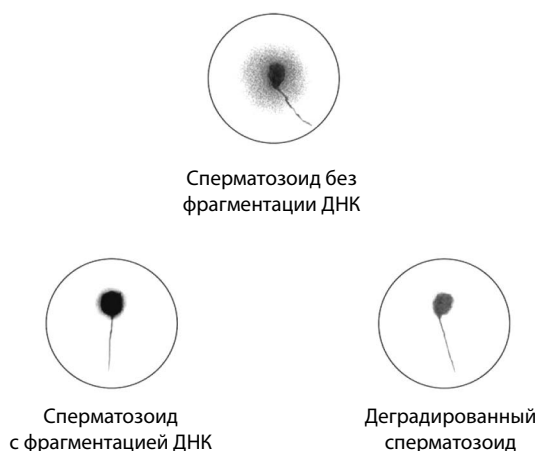


Рис. 1. Сперматозоиды с различной степенью фрагментации ДНК
Fig. 1. Spermatozoa with varying degrees of DNA fragmentation

Достаточно простым и доступным тестом для оценки ДНК-фрагментации сперматозоидов является непрямой метод определения фрагментации ДНК – Sperm chromatin dispersion test (SCD), основанный на дисперсии хроматина сперматозоидов с последующей их окраской и визуализацией под микроскопом. Принцип метода состоит в том, что после специальной обработки сперматозоидов, заключающейся в денатурации и удалении ядерных белков, сперматозоиды с фрагментированной ДНК не создают характерный ореол (гало) диспергированных петель ДНК, который наблюдается у сперматозоидов с нефрагментированной ДНК (рис. 1). Преимуществом метода является простота выполнения и возможность использования в любой клиничко-диагностической лаборатории в качестве скринингового исследования для оценки степени фрагментации ДНК сперматозоидов.

Во многих случаях причины мужского бесплодия устранимы, поэтому адекватно проведенные диагностические мероприятия позволяют прогнозировать детородную функцию и при необходимости использовать вспомогательные репродуктивные технологии. Таким образом, введение в клиничко-лабораторную практику новых диагностических методов выявления причин мужского бесплодия считается важнейшим направлением современной репродуктологии.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить клиничко-лабораторную значимость определения ДНК-фрагментации сперматозоидов в качестве теста оценки фертильности эякулята мужчин, страдающих бесплодием.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы 105 мужчин в возрасте от 23 до 55 лет с бесплодием, контингент которых был разделен на 2 группы: исследуемую (1), которую составили 45 мужчин

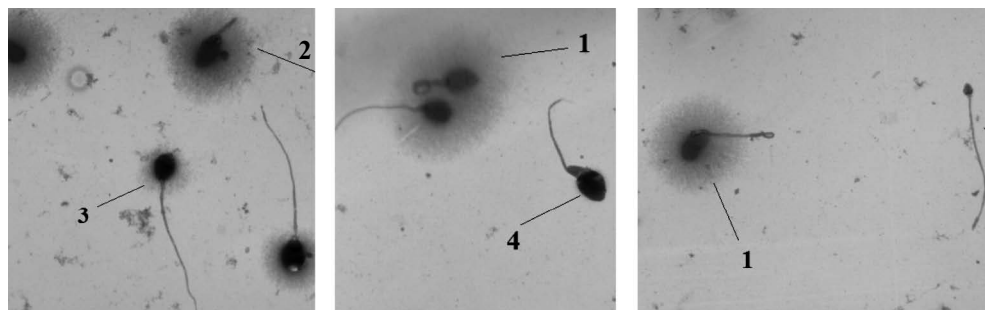


Рис. 2. Сперматозоиды, окрашенные с использованием набора Halosperm G2

Примечания: 1 – сперматозоид с большим гало, 2 – сперматозоид со средним гало, 3 – сперматозоид с малым гало, 4 – сперматозоид без гало, 5 – деградированный сперматозоид.

Fig. 2. Spermatozoa stained with the Halosperm G2 kit

Notes: 1 – sperm with a large halo, 2 – sperm with medium halo, 3 – sperm with small halo, 4 – sperm without halo, 5 – degraded sperm.

с идиопатической патологией, и группу сравнения (2), представленную 60 мужчинами с нормозооспермией, не имевшими фенотипических проявлений генетической патологии.

Исследование эякулята включало в себя определение количества, подвижности, жизнеспособности и морфологии сперматозоидов с использованием традиционных методов исследования.

Количество и подвижность сперматозоидов оценивались в нативном препарате, жизнеспособность – в мазке, окрашенном по Блюму, их морфология – в мазке, подвергнутом окраске с использованием набора Spermac Stain (Испания). Выявление и установление особенностей фрагментации ДНК сперматозоидов проводились методом оценки дисперсии хроматина сперматозоидов (Sperm Chromatin Dispersion – SCD) в мазке, окрашенном с применением набора реагентов Halosperm G2 (Испания).

Интерпретация результатов метода SCD. Подсчитывалось минимум 300 сперматозоидов с градацией их по особенностям дисперсии ДНК на три группы (рис. 2):

1. Сперматозоиды без фрагментации ДНК:

- половые клетки с большим ареолом – ширина гало $\geq$ диаметру ядра половой клетки;
- половые клетки с гало среднего размера.

2. Сперматозоиды с фрагментированной ДНК:

- сперматозоиды с малым гало – ширина гало $\leq 1/3$ диаметра ядра;
- сперматозоиды без гало.

3. Сперматозоиды деградированные.

Индекс фрагментации сперматозоидов SDFI (Sperm DNA Fragmentation Index) подсчитывался по формуле:

$$\text{SDFI} = \frac{\text{FS} + \text{DS}}{S} \times 100,$$



где FS – количество фрагментированных сперматозоидов;
DS – количество деградированных сперматозоидов;
S – общее число подсчитанных сперматозоидов.

Индекс деградации сперматозоидов DDSI (Degraded DNA Sperm Index) подсчитывался по формуле:

$$DDSI = \frac{DS}{FS} \times 100.$$

Для интерпретации результатов исследования были использованы референтные значения индекса фрагментации ДНК сперматозоидов, рекомендованные Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) [10]:

- низкий SDFI <15%;
- средний SDFI 15–30%;
- высокий SDFI >30%.

Значение индекса деградации (DDSI) ≥30% расценивается как отклонение от нормы и указывает на возможное наличие у пациента скрытого течения варикоцеле. Статистическая обработка полученных данных и установление корреляционных зависимостей производились с помощью программы Statistica (StatSoft Statistica v.6.0).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных данных был произведен расчет статистических показателей коэффициентов фрагментации и деградации (табл. 1), а также корреляционных связей данных индексов с показателями интегральной оценки спермограммы в виде нормозооспермии и олигозооспермии (табл. 2, 3).

В ходе исследования выявлены различия ключевых показателей ДНК-фрагментации у мужчин исследуемой группы и группы сравнения: индекса фрагментации (30,6% – в исследуемой группе, что на 8,3% выше, чем в группе сравнения) и индекса деградации (20,2% – исследуемая группа, что на 1,7 % выше, чем в группе сравнения).

Таким образом, представляется возможным судить о наличии нарушений в строении ДНК (фрагментации) у пациентов с концентрацией сперматозоидов в эякуляте ниже нормы (олигозооспермией).

Таблица 1
Статистические показатели ДНК-фрагментации и деградации
Table 1
Statistical indicators of DNA fragmentation and degradation

Показатели ДНК-фрагментации	Группа сравнения	Исследуемая группа
Индекс фрагментации, %	$\bar{X}$: 14,6±29,7 me: 22,3 max: 65,0, min: 2,75	$\bar{X}$: 28,0±53,5 me: 30,6 max: 61,7, min: 13,8
Индекс деградации, %	$\bar{X}$: 10,11±25,4 me: 18,5 max: 53,3, min: 4,0	$\bar{X}$: 17,39±25,81 me: 20,2 max: 26,7, min: 6,07

Примечание: $\bar{X}$ – среднее, me – медиана, max – максимальное значение, min – минимальное значение.

Таблица 2
Корреляция индекса фрагментации с основными показателями спермограммы пациентов группы сравнения и исследуемой группы
Table 2
Correlation of the fragmentation index with the main indicators of the spermogram of patients in the comparison group and the study group

Показатели спермограммы	Индекс фрагментации у пациентов с нормозооспермией	Индекс фрагментации у пациентов с олигозооспермией
	Значение r	
Жизнеспособность	-0,455	-0,516*
Подвижность	-0,504*	-0,641*
Сперматозоиды с нормальной морфологией	-0,072	-0,389

Примечания: r – коэффициент корреляции; * p<0,05.

Таблица 3
Корреляция индекса деградации с основными показателями спермограммы пациентов группы сравнения и исследуемой группы
Table 3
Correlation of the degradation index with the main indicators of the spermogram of patients in the comparison group and the study group

Показатели спермограммы	Индекс деградации у пациентов с нормозооспермией	Индекс деградации у пациентов с олигозооспермией
	Значение r	
Жизнеспособность	0,042	-0,544*
Подвижность	-0,104	-0,410
Сперматозоиды с нормальной морфологией	-0,061	-0,180

Примечание: r – коэффициент корреляции; * p<0,05.

Корреляционный анализ показал наличие средней отрицательной связи индекса фрагментации с показателями подвижности сперматозоидов и жизнеспособности в семенной жидкости у пациентов с олигозооспермией ($r=-0,641$ и $r=-0,516$ соответственно) и с показателем подвижности сперматозоидов у пациентов группы сравнения ($r=-0,504$) (табл. 2). Другие показатели спермограммы имеют слабую корреляционную связь с индексом фрагментации ДНК. Индекс деградации имеет среднюю отрицательную корреляционную связь с показателями жизнеспособности сперматозоидов в группе пациентов с олигозооспермией ($r=-0,544$) и слабую корреляционную связь с другими показателями спермограммы в обеих группах. Таким образом, можно говорить об отрицательной связи индекса фрагментации ДНК с подвижностью и жизнеспособностью сперматозоидов у пациентов с олигозооспермией и отрицательной зависимости подвижности сперматозоидов у пациентов с нормозооспермией, страдающих бесплодием.

Согласно эпидемиологическим данным у значительной части мужчин с бесплодием и повышенной степенью фрагментации ДНК сперматозоидов при исследовании спермограммы может наблюдаться нормозооспермия, то есть отсутствие каких-либо отклонений от нормы [11].

В связи с тем, что повышенный уровень фрагментации ДНК сперматозоидов может приводить к снижению вероятности самостоятельного зачатия в паре, а также



в связи с отсутствием однозначных данных о связи ДНК-фрагментации с отрицательными результатами ЭКО или ИКСИ, Европейская ассоциация урологов и Американское общество по репродуктивной медицине рекомендуют проведение теста на фрагментацию ДНК в случае наличия замерших беременностей у партнерши и при неудачных попытках достижения беременности методами вспомогательных репродуктивных технологий [12, 13].

Таким образом, определение фрагментации ДНК сперматозоидов необходимо расценивать как самостоятельный тест, который рекомендуется использовать в совокупности с другими лабораторными тестами для оценки возможности применения вспомогательных репродуктивных технологий, а также в качестве скринингового метода перед проведением молекулярно-генетического исследования. Роль и значение определения фрагментации ДНК в диагностике мужского бесплодия требует дальнейшего изучения.

■ ВЫВОДЫ

1. Полученные результаты послужили основанием для рекомендации исследования теста оценки дисперсии хроматина сперматозоидов (Sperm chromatin dispersion test (SCD)) при нарушении фертильности мужчин в качестве скринингового теста для определения тактики дальнейших исследований (в том числе молекулярно-генетических) с целью диагностики и установления причин infertility.
2. Исследование ДНК-фрагментации следует применять в качестве самостоятельного теста при выяснении причин бесплодия, вне зависимости от результата оценки спермограммы, что обусловлено отсутствием в ряде случаев связи индекса фрагментации ДНК сперматозоидов с большинством показателей спермограммы.
3. Исследование степени фрагментации ДНК сперматозоидов имеет особую диагностическую ценность при оценке фертильного статуса мужчин с олигозооспермией.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Inhorn MC, Patrizio P. (2015) Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update*, vol. 21(4), pp. 411–26.
2. Korshunov M.N., Korshunova E.S., Kyzlasov P.S., Korshunov D.M., Darenkov S.P. (2021) Structural disorders of the sperm chromatin. Pathophysiological aspects. *Clinical relevance. Vestnik Urologii*, vol. 9(1), pp. 95–104.
3. Khayat S.Sh., Bragina E.E., Arifulin E.A., Lazareva E.M., Sorokina T.M., Kurilo L.F., Chernykh V.B. (2019) Sperm DNA fragmentation in men of different age. *Andrology and genital surgery*, vol. 20(4), pp. 39–44.
4. Santi D., Spaggiari G., Simoni M. (2018) Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management – meta-analyses. *Reprod Biomed Online*, vol. 37(3), pp. 315–326.
5. Aytkozina L.K., Kudaybergenov T.K., Biktasheva K.M., Bekzatova K.A. (2019) DNA fragmentation of spermatozoa as one of the clinical tools study of idiopathic infertility. Literature review. *Eurasian Scientific Association*, vol. 48(2), pp. 93–96.
6. Rudneva S.A., Bragina E.E., Arifulin E.A., Sorokin T.M., Shileyko L.V., Ermolaeva S.A., Kurilo L.F., Chernykh V.B. (2014) DNA fragmentation in spermatozoa and its relationship with impaired spermatogenesis. *Andrology and genital surgery*, vol. 15 (4), pp. 26–33.
7. Simon L., Zini A., Dyachenko A., Ciampi A., Carrell DT. (2017) A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl*, vol. 19(1), pp. 80–90.
8. Gamidov S.I., Ovchinnikov R.I., Popova A.Yu., Golubeva O.N., Ushakova I.V. (2016) The role of a man in the habitual miscarriage of a wife. *Urology*, vol. 1-S1, pp. 35–43.
9. Khadem N., Poorhoseyni A., Jalali M., Akbary A., Heydari S.T. (2014) Sperm DNA fragmentation in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia*, vol. 46(2), pp. 126–30.
10. WHO laboratory manual for examination and processing of human semen – 5th ed. (2010).
11. Trebka E.G., Markevich A.L., Pribushenya O.V., Khurs O.M., Gusina N.B. (2014) Chromosome anomalies under spermatogenesis disorders. *Healthcare*, vol. 5, pp. 4–12.
12. Liu R. Z. (2012) AZF deletions and male infertility. *National journal of andrology*, vol. 18, pp. 963–968.
13. Nekrasova I.L., Shestakova V.G., Ivanov A.G., Artamonov A.A. (2015) Sperm DNA fragmentation research in the diagnosis of male infertility. *Upper Volga Medical Journal*, vol. 14 (3), pp. 42–44.