

© Н.Э. Авадиева, 2019  
УДК 577.213.3:611.013.11:616.64/.69  
DOI 10.21886/2308-6424-2019-7-1-7-11  
ISSN 2308-6424

## Применение ДНК фрагментации спермы в андрологической практике

Н.Э. Авадиева

МБУЗ «Городская поликлиника № 10 г. Ростова-на-Дону»; Ростов-на-Дону, Россия

**Актуальность.** Несмотря на многочисленные способы лечения бесплодия в браке, в том числе и методы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), сохраняется значительная доля пациентов с инфертильностью.

**Цель исследования.** Повышение эффективности диагностики пар с двумя и более замершими беременностями в анамнезе.

**Материалы и методы.** Обследованы 38 пациентов в возрасте от 22 до 38 лет с диагнозом бесплодие.

**Результаты.** Наиболее частой формой патоспермии при замершей беременности является тератозооспермия (53%), астенозооспермия встречается в 21% случаев, астенотератозооспермия – 8%. Нормозооспермия регистрируется у 18% пациентов. При определении ДНК фрагментации спермы, оказывается, что лишь около 20% исследуемых не имеют данную патологию.

**Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения вклада патоспермии, а в частности тератозооспермии, и нарушения ДНК фрагментации спермы в репродуктивные потери.

**Ключевые слова:** бесплодие; репродуктивные потери; нарушение ДНК фрагментации спермы; патоспермия; тератозооспермия; конденсация хроматина

**Раскрытие информации:** Исследование не имело спонсорской поддержки. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила в редакцию:** 15.02.2019. **Принята к публикации:** 07.03.2019.

**Автор для связи:** Авадиева Надежда Эдуардовна; тел.: +7 (906) 414-47-59; e-mail: avadnadya@mail.ru

**Для цитирования:** Авадиева Н.Э. Применение ДНК фрагментации спермы в андрологической практике. *Вестник урологии*. 2019;7(1):7-11. DOI: 10.21886/2308-6424-2019-7-1-7-11

## The use of DNA semen fragmentation in andrological practice

N.E. Avadieva

Rostov-on-Don City Polyclinic №10; Rostov-on-Don, Russian Federation

**Introduction.** Despite numerous methods of treating infertility including methods of assisted reproductive technology a significant proportion of patients remains with infertility.

**Purpose of the study.** Improving the efficiency of the diagnosis of couples with two or more missed pregnancies in history.

**Materials and methods.** We examined 38 patients aged from 22 to 38 years with a diagnosis of infertility.

**Results.** The most common form of prospermia with missed abortion is teratozoospermia (53%), asthenozoospermia occurs in 21% of cases, asthenoteratozoospermia - 8%. Normospermia is recorded in 18% of patients. When determining the DNA of semen fragmentation, it turns out that only about 20% of the subjects do not have this pathology.

**Findings.** The results indicate the need for further study of the contribution of prospermia, and in particular teratozoospermia, and DNA disruption of semen fragmentation to reproductive loss.

**Key words:** infertility; reproductive loss; impaired DNA semen fragmentation; paospermia; teratozoospermia; chromatin condensation

**Disclosure:** The study did not have sponsorship. The author have declared no conflicts of interest.

**Received:** 15.02.2019. **Accepted:** 07.03.2019.

**For correspondence:** Nadezhda E. Avadieva; tel.: +7 (906) 414-47-59; e-mail: avadnadya@mail.ru

**For citation:** Avadieva N.E. The use of DNA semen fragmentation in andrological practice. *Urology Herald* 2019;7(1):7-11. (In Russ.). DOI: 10.21886/2306-6424-2019-7-1-7-11

## Введение

**Ф**ертильность, является одной из важных и сложных биологических функций человека. По данным литературы 15% сексуально активных пар не достигают беременности в течение 1 года и обращаются за лечением бесплодия, 5% пар остаются бездетными, несмотря на попытки лечения. У половины бездетных пар бесплодие связано с «мужским фактором», проявляющимся отклонениями параметров эякулята [1 - 4].

Инфертильность обусловлена, как правило, влиянием различных факторов: врожденные аномалии мочеполовых органов; злокачественные опухоли; варикоцеле; эндокринные нарушения; генетические заболевания; инфекционно-воспалительные заболевания репродуктивных органов; иммунологические факторы [1, 3 - 5]. Все вышеперечисленное может приводить к качественным и количественным нарушениям эякулята [6, 7].

Для выявления патоспермии используются различные методы диагностики, которые делят на обязательные и дополнительные методы обследования мужчин. К обязательным методам исследования инфертильности относят: спермиологическое (спермограмма, MAP-тест (mixed antiglobulinreaction, MAR-test), гормональные (исследование в сыворотке крови общего тестостерона, фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона), пролактина, тиреотропный гормона, ингибин В, витамин Д), микробиологические (бактериологическое исследование эякулята), методы ДНК-диагностики (полимеразная цепная реакция – ПЦР), сонографические (ультразвуковое исследование органов мошонки с доплерографией вен лозовидного сплетения).

К дополнительным методам исследования эякулята относят: биохимическое исследование эякулята, тест на ДНК фрагментацию спермы, определение активных форм кислорода в сперме (Reactive Oxygen Species (ROS), тест на оплодотворяющую способность (HBA-тест, hualuron-binding assay), электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов (ЭМИС), тест на зрелость сперматозоидов по соотношению гистон/протамин, функциональные тесты Шуварского, Курцрока-Миллера, данные о значении конденсации целостности ДНК ядра [7].

Для того чтобы получить более подробные данные биологических основ мужского бесплодия, разработан ряд функциональных тестов, направленных на оценку способности спермиев

осуществлять оплодотворение. Данные о значении конденсации целостности ДНК ядра показывают ассоциацию между целостностью ДНК, организацией хроматина в сперматозоидах и фертильностью, повышая, при этом, вероятность появления ошибок в генетическом материале.

Одной из самых частых причин нарушений в ДНК сперматозоида является возникновение микроповреждений (фрагментаций). К наиболее распространённым методам диагностики ДНК фрагментации относятся:

- TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling) – выявляет разрывы в ДНК с помощью уридина на 3-ОН конце;
- SCSA (sperm cromatin structure assay) – выявляет ss и ds ДНК с помощью акридинового оранжевого и позволяет определить индекс фрагментации;
- COMET – электрофорез фрагментов ДНК, полученных в нейтральных условиях (ds разрывы ДНК);
- SCD – выявляет степень фрагментации ДНК в образцах спермы в результате хроматической дисперсии.

При анализе эякулята мужчин группы контроля по сравнению с парами с привычным невынашиванием беременности были выявлены различные формы патоспермии: снижение количества прогрессивно-подвижных сперматозоидов почти у 30%, снижение количества морфологически нормальных сперматозоидов более чем у половины пациентов, повышение количества сперматозоидов с фрагментированной ДНК (17%), повышение сперматозоидов с нарушением упаковки ядерного хроматина (11,8% – 23,6%) [3].

Eisenberg ML в 2017 году провёл исследование качества спермы и невынашивания беременности в когорте пар, включённых в исследования до зачатия [8]. Из 347 пар, у которых во время исследования наступила беременность в 98 случаях (28%) произошла её потеря. Между парами, потерявшими и сохранившими беременность, не отмечено различий по объёму эякулята, концентрации, общему количеству, жизнеспособности и морфологии сперматозоидов. У мужчин в парах, потерявших беременность, качество спермы (по совокупности всех оцененных показателей) была хуже, чем у мужчин в парах, сохранивших беременность. Процентные доли по фрагментации ДНК также были сходными в группах невынашивания/сохранения беременности, но показатели более 30% были положительно связаны с потерей беременности.

Также в 2017 году проведено исследование фрагментации ДНК спермы в итальянских парах с привычным невынашиванием беременности [9]. Обследовано 112 мужчин из пар с привычным невынашиванием беременности. За исключением объема эякулята, показатели спермограммы у фертильных и с привычным невынашиванием пар были сопоставимы и были лучше, чем у бесплодных. Средние показатели фрагментации ДНК показали положительную корреляцию с возрастом пациентов, с привычным невынашиванием беременности и количеством выкидышей. Результаты показывают корреляцию между увеличением фрагментации ДНК и нарушением репродуктивной функцией, как с точки зрения оплодотворения, так и невынашивания беременности.

Vareh GM, Jacoby EC et al в 2016 году исследовали корреляцию нормозооспермии и невынашивания беременности – средние показатели фрагментации ДНК спермиев у больных с нормозооспермией и невынашиванием беременности в 4 раза больше, чем в группе контроля (36,8% против 9,4%) [10].

Согласно исследованиям Agarwal A, Prabakaran S и Allamaneni SS высокие уровни фрагментации ДНК негативно влияют на некоторые показатели ВРТ: частоту оплодотворения, скорость деления эмбрионов, имплантацию, беременность, коэффициент рождаемости [11]. Авторы считают, что повреждения ДНК могут служить диагностическим маркером негативного отцовского эффекта в отношении преимплантационного развития человека. Сперматозоиды со значительным уровнем повреждения ДНК могут блокировать развитие бластоцист и имплантации [12, 13].

Все вышеперечисленное несомненно определяет высокую актуальность проблемы фраг-

ментации ДНК в развитии замершей беременности и обуславливает необходимость её глубокого изучения.

**Цель исследования.** Повышение эффективности диагностики пар с двумя и более замершими беременностями в анамнезе.

### Материалы и методы

Обследованы 38 пациентов в возрасте от 22 до 38 лет с диагнозом бесплодие. В анамнезе у всех пар 2 и более замерших беременностей на сроках до 10 недель. Повторные беременности наступали в течение года, однако вновь приводили к замершим беременностям. Критерием исключения были: наличие у супруги выявленных изменений в гемостазе и гормональных показателях, как одних из значимых факторов невынашивания беременности.

Оценка оплодотворяющей способности эякулята проводилась в соответствии с критериями рекомендованными ВОЗ (2010) в клинично-диагностической лаборатории, спермограмма выполнялась с использованием строгих критериев Крюгера, MAP-тест. Морфологический анализ эякулята проводили на обработанных отмытых сперматозоидах, окрашенных по методу Diff-Quick. ДНК фрагментацию спермы выполнялась с помощью методики TUNEL.

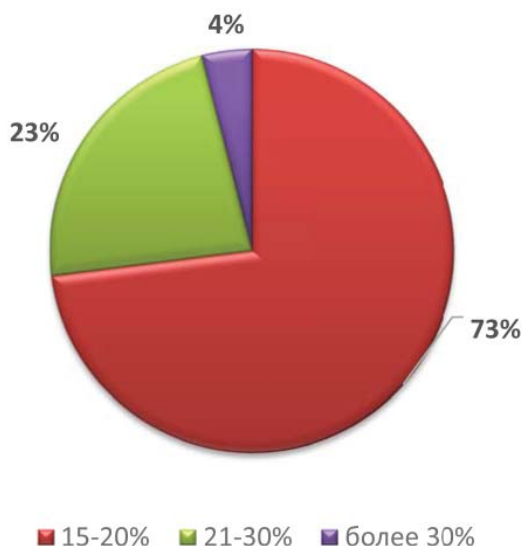
### Результаты

При анализе эякулята, только у 18,4% пациентов, выявлена нормозооспермия. Кроме того, у 7,9% пациентов выявлены сочетания нескольких форм патоспермии – астенотератозооспермия (рис. 1).



**Рисунок 1.** Частота встречаемости различных патологий эякулята в исследуемой группе  
**Figure 1.** Occurrence's frequency of various ejaculate pathologies in the study group

При исследовании эякулята на ДНК-фрагментацию, патология была выявлена у 30 (79%) пациентов (рис. 2). Кроме того, у 22 (73%) ДНК фрагментация составляла 15-20%, у 7 (23%) – 21-30%, у 1 (4%) более 30% (рис. 2).



**Рисунок 2.** Частота встречаемости разных степеней повреждения ДНК сперматозоидов в исследуемой группе  
**Figure 2.** Occurrence's frequency of different damage degrees of DNA sperm in the study group

Таким образом, при исследовании спермы мужчин, супруги, которых имели в анамнезе 2 и более замершие беременности, наиболее часто встречается тератозооспермия (52,63%). Однако данная патология не всегда является монопричиной. При использовании более углублённого обследования, в частности определение ДНК фраг-

ментации спермы, оказывается, что лишь около 20% исследуемых не имеют данную патологию.

### Обсуждение

Наличие разрывов в ДНК может служить индикатором апоптоза – программируемой клеточной гибели. На основании Кохрановского обзора 2011 года от 30% до 80% мужчин субфертильны вследствие действия оксидативного стресса [14].

Существует масса факторов, приводящих к появлению разрывов в ДНК сперматозоидов: вредные привычки (табакокурение, алкоголь, наркотические вещества), электромагнитное излучение, влияние токсинов (хлоросодержащие соединения, пестициды и т. д.), травмы и перекруты яичек, воспалительные заболевания мочеполовой системы [7].

Но многими исследователями отмечается, что параметры фрагментации не имеют чёткой корреляции с параметрами спермограммы (в частности концентрацией, подвижностью, морфологие [10, 12, 13]. Ряд исследователей отмечают, что нет достоверной разницы в апоптотическом индексе между нормальными и аномальными сперматозоидами по критериям ВОЗ [7].

### Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения вклада патоспермии, тератозооспермии в репродуктивные потери. Учитывая наличие ДНК фрагментации в развитии замерших беременностей, имеет смысл внести данное исследование в стандарт обследования мужчин, а также углубить поиск предикторов данного состояния.

### ЛИТЕРАТУРА

1. WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male. Cambridge. Cambridge University Press; 2009.
2. A Jungwirth (Ed.), T Diemer, GR Dohle et al. Guidelines on Male Infertility. European Association of Urology; 2015.
3. Oumaima A, Tesnim A, Zohra H, Amira S, Ines Z, Sana C, Intissar G, Lobna E, Ali J, Meriem M. Investigation on the origin of sperm morphological defects: oxidative attacks, chromatin immaturity, and DNA fragmentation. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018;25(14):13775-13786. DOI: 10.1007/s11356-018-1417-4
4. Ибишев Х.С., Магомедов Г.А., Рябенченко Н.Н. Причастность папилломавирусной инфекции к нарушению мужской фертильности. *Вопросы урологии и андрологии.* 2018;6(3):22-27. DOI: 10.20953/2307-6631-2018-3-22-27
5. Ибишев Х.С., Коган М.И., Магомедов Р.Г., Крайний П.А. Современный взгляд на патогенетические основы хронического рецидивирующего бактериального простатита. *Эффективная фармакотерапия.* 2017;42:6-10. eLIBRARY ID: 30798487

### REFERENCES

1. WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male. Cambridge. Cambridge University Press; 2009.
2. A Jungwirth (Ed.), T Diemer, GR Dohle et al. Guidelines on Male Infertility. European Association of Urology; 2015.
3. Oumaima A, Tesnim A, Zohra H, Amira S, Ines Z, Sana C, Intissar G, Lobna E, Ali J, Meriem M. Investigation on the origin of sperm morphological defects: oxidative attacks, chromatin immaturity, and DNA fragmentation. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018;25(14):13775-13786. DOI: 10.1007/s11356-018-1417-4
4. Ibishev KhS, Magomedov GA, Ryabenchenko NN. Role of human papillomavirus infection in male infertility. *Vopr. urol. androl. (Urology and Andrology).* 2018;6(3):22-27. (In Russ.). DOI: 10.20953/2307-6631-2018-3-22-27
5. Ibishev KhS, Kogan MI, Magomedov RG, Krainy PA. Modern View on the Pathogenetic Foundations of the Chronic Recurrent Bacterial Prostatitis. *Effektivnaya farmakoterapiya.* 2017;42:6-10. (in Russ.). eLIBRARY ID: 30798487

6. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Ed). *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3<sup>rd</sup>. 2010.
7. Руководство по клинической андрологии. Под редакцией Виноградова И.В. 2018.
8. Eisenberg ML, Sapra KJ, Kim SD, Chen Z, Buck Louis GM. Semen quality and pregnancy loss in a contemporary cohort of couples recruited before conception: data from the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment (LIFE) Study. *Fertil Steril*. 2017;108(4):613-619. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.07.008.
9. Carlini T, Paoli D, Pelloni M, Faja F, Dal Lago A, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Sperm DNA fragmentation in Italian couples with recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online*. 2017;34(1):58-65. DOI: 10.1016/j.rbmo.2016.09.014.
10. Barih GM, Jacoby E, Binkley P, Chang TC, Schenken RS, Robinson RD. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation assessment in normozoospermic male partners of couples with unexplained recurrent pregnancy loss: a prospective study. *Fertil Steril*. 2016;105(2):329-36.e1. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.10.033
11. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2006;12(5):630-633. PMID: 16790111
12. Tesarik J, Mendoza C. Effects of exogenous LH administration during ovarian stimulation of pituitary down-regulated young oocyte donors on oocyte yield and developmental competence. *Hum Reprod*. 2002;17(12):3129-3137. PMID: 12456612
13. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod*. 2003;18(5):1023-1028. PMID: 12721180
14. Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(12):CD007411. DOI: 10.1002/14651858.CD007411.pub3

#### Сведения об авторе

**Авадиева Надежда Эдуардовна** – к.м.н.; врач-уролог МБУЗ «Городская поликлиника №10 г. Ростова-на-Дону  
ORCID iD 0000-0002-8787-1452  
e-mail: avadnadya@mail.ru

#### Information about the author

**Nadezhda E. Avadieva** – M.D., Ph.D. (M); Urologist, Rostov-on-Don City Polyclinic №10  
ORCID iD 0000-0002-8787-1452  
e-mail: avadnadya@mail.ru