

Прогностическая ценность различных показателей спермы относительно мужской фертильности

А.Ю. Метелев¹, А.Б. Богданов^{1,2}, Е.В. Ивкин^{1,2}, А.А. Митрохин¹, М.М. Воднева¹,
Я.А. Черкезов³, Е.И. Велиев^{1,2}, О.Б. Лоран^{1,2}

¹ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» Департамента здравоохранения г. Москвы;
Россия, 125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, 5;

²кафедра урологии и хирургической андрологии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования»
Минздрава России; Россия, 125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, 5а;

³отделение репродуктологии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства
и гинекологии»; Россия, 101000, Москва, ул. Покровка, 22а

Контакты: Алексей Юрьевич Метелев urometelev@mail.ru

Введение. Одной из возможных причин снижения фертильного потенциала мужчин является фрагментация ДНК сперматозоидов. Однако не выявлено значимой корреляции между традиционными параметрами спермы и фрагментацией ДНК сперматозоидов. С учетом этого актуальность представляет изучение влияния различных показателей спермы на фертильность мужчин.

Материалы и методы. Исследование включало 60 мужчин в возрасте 26–36 лет (медиана – 30 лет) с идиопатическим бесплодием и уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов более 15 %. У них проведен курс лечения с помощью гипербарической оксигенации, после этого через 3 мес выполняли процедуру экстракорпорального оплодотворения. Фрагментацию ДНК сперматозоидов определяли с помощью метода TUNEL (верхняя граница нормы – 15 %). Уровень активных форм кислорода (АФК) в эякуляте определяли методом хемилуминесценции (верхняя граница нормы – 0,64 мВ/с).

Результаты. Частота беременности у партнерши при экстракорпоральном оплодотворении составила: 62,8 и 64,7 % ($p > 0,05$) при количестве сперматозоидов $< 38 \times 10^6$ и $\geq 38 \times 10^6$ соответственно; 63,3 и 63,6 % ($p > 0,05$) при подвижности ($a + b$) сперматозоидов < 40 и ≥ 40 % соответственно; 58,3 и 64,6 % ($p > 0,05$) при количестве нормальных форм сперматозоидов < 4 и ≥ 4 % соответственно; 67,3 и 20,0 % ($p < 0,05$) при уровне фрагментации ДНК сперматозоидов ≤ 15 и > 15 % соответственно; 64,9 и 33,3 % ($p < 0,05$) при уровне АФК в сперме $\leq 0,64$ и $> 0,64$ мВ/с соответственно.

Заключение. Вероятность наступления беременности после экстракорпорального оплодотворения достоверно зависит от уровня фрагментации ДНК сперматозоидов и АФК в сперме.

Ключевые слова: мужское бесплодие, фрагментация ДНК сперматозоидов, активные формы кислорода в эякуляте

DOI: 10.17650/2070-9781-2015-16-4-51-54

The predictive value of various indicators of sperm for male fertility

A. Yu. Meteleev¹, A. B. Bogdanov^{1,2}, E. V. Ivkin^{1,2}, A. A. Mitrokhin¹, M. M. Vodneva¹,
Ya. A. Cherkeзов³, E. I. Veliev^{1,2}, O. B. Loran^{1,2}

¹S.P. Botkin Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department; 5th Botkinskiy Proezd, Moscow, 125284, Russia;

²Department of Urology and Surgical Andrology, Russian Medical Academy for Postgraduate Education, Ministry of Health of Russia;
5a 2nd Botkinskiy Proezd, Moscow, 125284, Russia;

³Department of Reproductology, Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology;
22a Pokrovka St., Moscow, 101000, Russia

Introduction. DNA fragmentation of sperm is one of the possible causes of reduced fertility potential of men. However, a significant correlation between conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation was not found. This fact determines the relevance of the study of the influence of various parameters of sperm on male fertility.

Materials and methods. The study included 60 men, aged 26–36 years (median – 30 years) with idiopathic infertility and the level of DNA fragmentation of sperm is higher than 15 %. These men were treated with hyperbaric oxygen therapy, after 3 months in vitro fertilization performed partners of these men. DNA fragmentation of sperm cells was determined by TUNEL (upper limit of normal – 15 %). The level of reactive oxygen species (ROS) of the ejaculate were determined by chemiluminescence (upper limit of normal – 0.64 mV/s).

Results. The frequency of pregnancy in vitro fertilization was following: 62.8 and 64.7 % ($p > 0.05$) for the total number sperm of spermatozoa $< 38 \times 10^6$ /ejaculate and $\geq 39 \times 10^6$ /ejaculate, respectively; 63.3 and 63.6 % ($p > 0.05$) for mobility ($a + b$) of spermatozoa < 40 and ≥ 40 %, respectively; 58.3 and 64.6 % ($p > 0.05$) for normal forms of spermatozoa < 4 and ≥ 4 %, respectively; 67.3 and 20.0 % ($p < 0.05$) for the level of DNA fragmentation of sperm ≤ 15 and > 15 %, respectively; 64.9 and 33.3 % ($p < 0.05$) for the level of ROS in semen ≤ 0.64 and > 0.64 mV/s, respectively.



Conclusion. *The probability of pregnancy after in vitro fertilization significantly depends on the levels of sperm DNA fragmentation in the sperm and level of ROS in semen.*

Key words: *male infertility, sperm DNA fragmentation, reactive oxygen species in semen*

Введение

Часто встречающейся в андрологической практике проблемой является идиопатическое мужское бесплодие, когда без изменений при физикальном осмотре, нарушений гормонального статуса и т. д. выявляются различные отклонения в эякуляте [1–4].

В качестве одной из возможных причин снижения фертильного потенциала у таких пациентов рассматривают фрагментацию ДНК сперматозоидов, представляющую собой одно- или двухцепочечный разрыв молекул ДНК [5]. В настоящее время не установлены все возможные этиологические факторы развития фрагментации ДНК сперматозоидов. По некоторым данным, к ее возникновению часто приводит повышение концентрации активных форм кислорода (АФК) или свободных радикалов в сперме [6–8]. Противоречивость проблеме придает тот факт, что во многих исследованиях показано отсутствие значимой корреляции между традиционными параметрами спермы и фрагментацией ДНК сперматозоидов [9–11]. К примеру, по данным ряда авторов, 25–40 % мужчин с нормальными показателями спермограммы имеют бесплодие вследствие повышения уровня фрагментации ДНК сперматозоидов более 20–30 % [12–14].

Таким образом, с учетом вышеуказанных проблемных вопросов актуальность приобретает исследование, целью которого является изучение прогностической значимости различных показателей спермы в отношении повышения фертильности мужчин и шансов наступления беременности у их половых партнеров.

Материалы и методы

В работу включены 60 мужчин с идиопатическим бесплодием и уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов более 15 %. У данной категории пациентов на базе ГКБ им. С.П. Боткина г. Москвы проведен курс лечения с помощью гипербарической оксигенации (ГБО), после этого через 3 мес выполняли процедуру экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Возраст пациентов составлял 26–36 лет, медиана – 30 лет. Традиционные параметры эякулята оценивали в соответствии с требованиями 5-го издания Руководства Всемирной организации здравоохранения (2010). Фрагментацию ДНК сперматозоидов определяли с помощью метода TUNEL. Результат теста оценивали в виде индекса фрагментации ДНК сперматозоидов, выраженного в процентах, что означало долю сперматозоидов с поврежденной ДНК. Верхней границей нормальных показателей степени фрагментации ДНК

сперматозоидов считали величину 15 %. Уровень генерации АФК в эякуляте измеряли методом хемилюминесценции с использованием люминометра LKB-Wallac 1256 (Финляндия) и выражали в мВ/с; верхней границей нормы продукции АФК считали 0,64 мВ/с. Исследование указанных показателей спермы проводили до ГБО и через 3 мес после нее.

ГБО выполняли по стандартной методике в барокамере отечественного производства БЛКС-303 с использованием медицинского кислорода. Всего проводили 10 сеансов – по 1 сеансу в день с перерывом на выходные дни. Общее время 1 сеанса составляло 60 мин, из которых компрессия – 5–10 мин, изопрессия – 40 мин, декомпрессия – 10 мин. Режимы баротерапии устанавливали индивидуально с учетом переносимости пациентом повышенного давления внутри камеры. Давление кислорода в режиме изопрессии в среднем составляло 1,2–2,0 АТА.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica v.17.0. Влияние различных показателей спермы на вероятность наступления беременности в результате ЭКО определяли с помощью одно- и многофакторного регрессионного анализа с вычислением показателя отношения шансов (ОШ) с 95 % доверительным интервалом (ДИ) для каждого изучаемого параметра. При нормальном распределении показателей в выборке пациентов данные представляли в виде среднего значения со средним квадратическим отклонением ($M \pm SD$), при ненормальном типе распределения – в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха ($Q_{25} \%$; $Q_{75} \%$).

Результаты и обсуждение

Через 3 мес после курса ГБО отмечено увеличение среднего значения общего количества сперматозоидов в эякуляте с $(28,8 \pm 12,2) \times 10^6$ до $(30,8 \pm 11,7) \times 10^6$ ($p < 0,05$), медианы подвижности (a + b) сперматозоидов с 28 до 30 % ($p < 0,05$), медианы количества нормальных форм сперматозоидов с 8 до 10 % ($p < 0,05$), а также снижение среднего уровня фрагментации ДНК сперматозоидов с $33,2 \pm 7,5$ до $11,9 \pm 5,9$ % ($p < 0,05$) и медианы уровня АФК в сперме с 0,89 до 0,39 мВ/с ($p < 0,05$). После выполнения ЭКО беременность половых партнеров наступила в 63,3 % (38/60) случаев.

Для исследования роли каждого из рассмотренных выше основных показателей спермы в наступлении беременности в результате ЭКО после курса ГБО значения каждого изучаемого признака были разделены на 2 группы:

- 1) общее количество сперматозоидов в эякуляте: $< 38 \times 10^6$ и $\geq 38 \times 10^6$;
- 2) подвижность (a + b) сперматозоидов: < 40 и ≥ 40 %;
- 3) количество нормальных форм сперматозоидов: < 4 и ≥ 4 %;
- 4) уровень фрагментации ДНК сперматозоидов: ≤ 15 и > 15 %;
- 5) уровень АФК в сперме: $\leq 0,64$ и $> 0,64$ мВ/с.

Результаты оценки корреляционной связи (*r*) данных признаков с исходами ЭКО (наступление или отсутствие беременности) приведены в табл. 1. Корреляция была признана статистически значимой только между уровнями фрагментации ДНК сперматозоидов и АФК в сперме и результатом ЭКО. При этом данная связь оказалась умеренной по своей силе.

Таблица 1. Корреляции основных показателей спермы с исходами ЭКО

Прогностические признаки	<i>r</i>	<i>p</i>
Общее количество сперматозоидов	0,03	$> 0,05$
Подвижность сперматозоидов	0,02	$> 0,05$
Морфология сперматозоидов	0,08	$> 0,05$
Уровень фрагментации ДНК сперматозоидов	-0,51	$< 0,05$
Уровень АФК в сперме	-0,39	$< 0,05$

Исходы ЭКО в зависимости от различных значений выбранных показателей спермы отражены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты ЭКО в зависимости от показателей спермы

Показатель и его значение	Частота наступления беременности после 1 процедуры ЭКО	<i>p</i>
Общее количество сперматозоидов в эякуляте		
$< 38 \times 10^6$	62,8 % (27/43)	$> 0,05$
$\geq 38 \times 10^6$	64,7 % (11/17)	
Подвижность (a + b) сперматозоидов		
< 40 %	63,3 % (31/49)	$> 0,05$
≥ 40 %	63,6 % (7/11)	
Количество нормальных форм сперматозоидов		
< 4 %	58,3 % (7/12)	$> 0,05$
≥ 4 %	64,6 % (31/48)	
Уровень фрагментации ДНК сперматозоидов		
≤ 15 %	67,3 % (37/55)	$< 0,05$
> 15 %	20,0 % (1/5)	
Уровень АФК в сперме		
$\leq 0,64$ мВ/с	64,9 % (37/57)	$< 0,05$
$> 0,64$ мВ/с	33,3 % (1/3)	

На основе выявленных особенностей взаимосвязи различных показателей спермы с исходами ЭКО проведен одно- и многофакторный регрессионный анализ по оценке вклада каждого из данных параметров спермы в вероятность наступления беременности. Окончательные результаты одно- и многофакторного анализа приведены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты одно- и многофакторного анализа факторов, влияющих на исходы ЭКО

Прогностический фактор	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (95 % ДИ)	<i>p</i>	ОШ (95 % ДИ)	<i>p</i>
Общее количество сперматозоидов: $\geq 38 \times 10^6$ против $< 38 \times 10^6$	1,08 (0,76–1,53)	$> 0,05$	1,11 (0,79–1,57)	$> 0,05$
Подвижность (a + b) сперматозоидов: ≥ 40 % против < 40 %	1,02 (0,72–1,44)	$> 0,05$	1,04 (0,73–1,46)	$> 0,05$
Количество нормальных форм сперматозоидов: ≥ 4 % против < 4 %	1,3 (0,92–1,84)	$> 0,05$	1,39 (0,98–1,89)	$> 0,05$
Уровень фрагментации ДНК сперматозоидов: ≤ 15 % против > 15 %	8,24 (5,82–11,65)	$< 0,05$	8,49 (5,89–11,74)	$< 0,05$
Уровень АФК в сперме: $\leq 0,64$ мВ/с против $> 0,64$ мВ/с	3,7 (2,61–5,23)	$< 0,05$	3,81 (2,73–5,44)	$< 0,05$

Таким образом, анализ показал, что только такие показатели спермы, как уровень фрагментации ДНК сперматозоидов и концентрация АФК, имеют достоверную прогностическую ценность в отношении мужской фертильности. Наши данные согласуются с выводами других авторов о большом вкладе этих показателей спермы в вероятность наступления беременности. Например, по данным разных исследований, при высокой степени фрагментации ДНК сперматозоидов вероятность беременности естественным способом снижается в 6,5–10,0 раза, с помощью внутриматочной инсеминации – в 7,0–8,7 раза, ЭКО – в 2 раза и интрацитоплазматической инъекции сперматозоида – в 1,5 раза относительно случаев с низкой степенью фрагментации ДНК [15, 16].

Кроме того, уникальность и ценность нашего исследования заключаются в том, что мировая литература включает только работы, в которых показано положительное влияние ГБО на традиционные параметры спермы, и в них отсутствует опыт использования ГБО в преодолении других прогностически значимых показателей спермы. Эффективность ГБО именно в коррекции этих двух важных показателей эякулята выд-

вигаает метод в число наиболее перспективных подходов к лечению пациентов данной категории. Тем не менее отсутствие подобных исследований диктует необходимость продолжения таких работ, после чего возможны окончательные выводы о преимуществах данного метода лечения.

Заключение

Результаты исследования показали, что вероятность наступления беременности после ЭКО достоверно зависит от уровней фрагментации ДНК сперматозоидов и АФК в сперме. При этом исход ЭКО в наибольшей

степени зависит от уровня фрагментации ДНК сперматозоидов: при нормальном значении этого показателя вероятность наступления беременности половой партнерши выше более чем в 8 раз относительно случаев повышенного уровня фрагментации ДНК. Полученные данные подтверждают важную роль уровней фрагментации ДНК сперматозоидов и АФК в сперме в обеспечении фертильности мужчин, а также указывают на необходимость и возможность коррекции указанных патологических изменений в сперме. Использование в этих целях метода ГБО показало большую перспективу в решении данной проблемы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rutinskiy A. I. Особенности диагностики идиопатического мужского бесплодия (обзор литературы). Медико-социальные проблемы семьи 2013;18(1):116–21. [Rutinskiy A. I. Peculiarities of the diagnosis of the idiopathic men's infertility (literature review). Mediko-sotsial'nye problemy sem'i = Medical and Social Problems of the Family 2013;18(1):116–21. (In Russ.)].
2. Sabanegh E. J., Agarwal A. Male infertility. In: Campbell-Walsh urology. 10th ed. Eds.: M. F. Campbell, P. C. Walsh, A. J. Wein. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2012. Pp. 616–47.
3. Jung J. H., Seo J. T. Empirical medical therapy in idiopathic male infertility: Promise or panacea? Clin Exp Reprod Med 2014;41(3):108–14.
4. Imamovic Kumalic S., Pinter B. Review of clinical trials on effects of oral antioxidants on basic semen and other parameters in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. Biomed Res Int 2014;2014:426951.
5. Lewis S. E., John Aitken R., Conner S. J. et al. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. Reprod Biomed Online 2013;27(4):325–37.
6. Walczak-Jedrzejowska R., Wolski J. K., Slowikowska-Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. Cent European J Urol 2013;66(1):60–7.
7. Aitken R. J., Jones K. T., Robertson S. A. Reactive oxygen species and sperm function – in sickness and in health. J Androl 2012;33(6):1096–106.
8. Ko E. Y., Sabanegh E. S. Jr, Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. Fertil Steril 2014;102(6):1518–27.
9. Patrizio P., Sanguineti F., Sakkas D. Modern andrology: from semen analysis to postgenomic studies of the male gametes. Ann NY Acad Sci 2008;1127:59–63.
10. Fraser L. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. Pol J Vet Sci 2004;7(4):311–21.
11. Das M., Al-Hathal N., San-Gabriel M. et al. High prevalence of isolated sperm DNA damage in infertile men with advanced paternal age. J Assist Reprod Genet 2013;30(6):843–8.
12. 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.
13. Avendaño C., Oehninger S. DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? J Androl 2011;32(4):356–63.
14. Giwercman A., Lindstedt L., Larsson M. et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility *in vivo*: a case-control study. Int J Androl 2010;33(1):e221–7.
15. Wyrobek A. J., Eskenazi B., Young S. et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103(25):9601–6.
16. Benchaib M., Lornage J., Mazoyer C. et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. Fertil Steril 2007;87(1):93–100.