

Фрагментация ДНК сперматозоидов у мужчин разного возраста

С.Ш. Хаят¹, Е.Е. Брагина^{1,2}, Е.А. Арифупин², Е.М. Лазарева³, Т.М. Сорокина¹, Л.Ф. Курило¹, В.Б. Черных^{1,4}

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119992 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40;

³Биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12;

⁴ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117437 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Елизавета Ефимовна Брагина bragor@mail.ru

Цель исследования — определить содержание сперматозоидов с одно- и двунитевыми разрывами ДНК в образцах эякулята у пациентов разных возрастных групп.

Материалы и методы. Исследован уровень фрагментации ДНК в 300 образцах эякулята, полученных от 266 пациентов с нарушением фертильности. В 1-ю группу включены 150 образцов, полученных от 131 пациента моложе 45 лет (21–44 лет), во 2-ю группу — 150 образцов, полученных от 135 пациентов старше 45 лет (45–68 лет). Средний возраст мужчин составил $34,8 \pm 3,9$ и $48,6 \pm 3,1$ года соответственно. Количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК оценивали методом флуоресцентного мечения одно- и двунитевых разрывов ДНК в мазках эякулята (методом TUNEL). Повышенным считали количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК >15 %. Стандартное спермиологическое исследование выполняли у 117 и 97 мужчин 1-й и 2-й групп соответственно.

Результаты. Количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК варьировало в образцах эякулята от 1,5 до 64,5 %. Среднее количество сперматозоидов с разрывами ДНК в 1-й группе ($12,0 \pm 6,0$ %) статистически значимо ниже, чем во 2-й группе ($16,1 \pm 8,3$ %, $p < 0,05$). Среднее количество сперматозоидов в эякуляте в 1-й группе статистически значимо больше ($267,0 \pm 198,7$ млн), чем во 2-й группе ($201,0 \pm 162,9$ млн, $p = 0,02$).

Заключение. У мужчин в возрасте старше 45 лет содержание сперматозоидов с фрагментированной ДНК статистически значимо больше, чем у мужчин моложе 45 лет ($p < 0,05$), что может косвенно свидетельствовать о повышенном уровне активных форм кислорода в семенной плазме.

Ключевые слова: бесплодие, репродукция, фрагментация ДНК сперматозоидов, возраст

Для цитирования: Хаят С.Ш., Брагина Е.Е., Арифупин Е.А. и др. Фрагментация ДНК сперматозоидов у мужчин разного возраста. Андрология и генитальная хирургия 2019;20(4):39–44.

DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-4-39-44

Sperm DNA fragmentation in men of different age

S.Sh. Khayat¹, E.E. Bragina^{1,2}, E.A. Arifulin², E.M. Lazareva³, T.M. Sorokina¹, L.F. Kurilo¹, V.B. Chernykh^{1,4}

¹N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia;

²A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University; Bld. 40, 1 Leninskie Gory, Moscow 119992, Russia;

³Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University; Bld. 12, 1 Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia;

⁴N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117437, Russia

The study objective is to analyze the content of spermatozoa with single and double-stranded DNA breaks in different age groups.

Materials and methods. The level of DNA fragmentation was studied in 300 ejaculate samples obtained from 266 sub- or infertile men. The group 1 included 150 samples obtained from 131 patients under the age of 45 (21–44 years), the group 2 included 150 samples obtained from 135 patients above the age of 45 (45–68 years). Mean ages were 34.8 ± 3.9 and 48.6 ± 3.1 years, respectively. The number of sperm with fragmented DNA was evaluated using the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) method on ejaculate smears. The number of spermatozoa with >15 % of fragmented DNA was considered elevated. Standard semen analysis was performed in 117 and 97 men from the groups 1 and 2, respectively.

Results. The number of sperm with fragmented DNA varied in ejaculated samples from 1.5 to 64.5 %. Mean number of sperm with DNA breaks in the group 1 (12.0 ± 6.0 %) was significantly lower than in the group 2 (16.1 ± 8.3 %, $p < 0.05$). Mean sperm count in the ejaculate of the group 1 (267.0 ± 198.7 million) was significantly higher than in the group 2 (201.0 ± 162.9 million, $p = 0.02$).

Conclusion. We revealed that in men over the age of 45 years, the percentage of spermatozoa with DNA fragmentation is higher than in men under 45 years of age, it may indirectly indicate an increased level of reactive oxygen species in the seminal plasma in older patients.

Key words: male infertility, reproduction, sperm DNA fragmentation, age

For citation: Khayat S. Sh., Bragina E. E., Arifulin E. A. et al. Sperm DNA fragmentation in men of different age. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2019;20(4):39–44. (In Russ.).

Введение

В последние десятилетия в развитых странах наблюдается тенденция к планированию деторождения в более поздние сроки, а также к неоднократному вступлению в брак, что обуславливает более позднее рождение детей в этих союзах. Все это диктует необходимость исследования факторов, влияющих на фертильность мужчин разного возраста. Мужская репродуктивная система по мере старения претерпевает физиологические изменения, морфологическая перестройка мужских половых желез связана в основном с атрофическими процессами; различные факторы могут нарушать функцию яичек и ухудшать качество спермы. Отрицательно воздействуют на мужскую репродуктивную систему и факторы образа жизни (питание, употребление алкоголя, курение, стресс, неблагоприятные экологические факторы, профессиональные вредности).

Спермиологическое исследование остается основным методом первоначальной оценки фертильности мужчин, отражая текущее состояние репродуктивной системы пациента. Спермограмма может указать на некоторые формы бесплодия (например, азооспермию), однако это исследование не всегда позволяет адекватно оценить фертильность. Известны случаи естественного зачатия при тяжелой степени патозооспермии и случаи бесплодия при нормозооспермии.

На оплодотворяющую способность сперматозоидов влияет ряд факторов, в том числе наличие анеуплоидий, состояние хроматина (конденсированный/незрелый), пенетрационной системы (акросом), строение жгутика и каждого из его компонентов, вирусное и бактериальное инфицирование сперматозоида, а также фрагментация ДНК. В связи с этим наряду со стандартным спермиологическим исследованием в последние годы все большее распространение получают методы, позволяющие исследовать функциональные свойства сперматозоидов.

Фрагментация ДНК сперматозоидов представляет собой разрыв 1 или 2 нитей ДНК. Патофизиологические механизмы, вызывающие фрагментацию ДНК, не вполне ясны, но предполагается, что ее причиной могут быть нерепарированные повреждения ДНК, дефекты ремоделирования хроматина, возникающие в ходе сперматогенеза. Причинами фрагментации хроматина сперматозоидов в настоящее время также считают апоптоз и окислительный стресс.

Проблеме фрагментации ДНК сперматозоидов посвящено большое количество научных исследований, однако данные о влиянии возраста на частоту разрывов ДНК неоднозначны, что объясняется как разнородностью исследуемых групп пациентов, так и гетерогенностью методов исследования. **Цель** данного исследования — определить содержание сперматозоидов с одно- и двунитевыми разрывами ДНК в образцах эякулята у пациентов разных возрастных групп. Для этого использован прямой метод подсчета, позволяющий определять как одонитевые, так и двунитевые разрывы ДНК.

Материалы и методы

Исследован уровень фрагментации ДНК в 300 образцах эякулята, полученных от 266 пациентов с нарушением фертильности. В 1-ю группу включены 150 образцов, полученных от 131 пациента моложе 45 лет (21–44 лет), во 2-ю группу — 150 образцов, полученных от 135 пациентов старше 45 лет (45–68 лет). Средний возраст мужчин составил $34,8 \pm 3,9$ и $48,6 \pm 3,1$ года соответственно.

Количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК оценивали методом флуоресцентного мечения одно- и двунитевых разрывов ДНК (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) в мазках эякулята. Мазки наносили на адгезивные стекла HistoBond (Paul Mariefeld, Германия) и обрабатывали реагентом DeadEnd Fluorometric TUNEL System по протоколу изготовителя (Promega, США). Препараты окрашивали DAPI (4,6-diamino-2-phenylidole) (Sigma-Aldrich, США). Для прямого подсчета использовали микроскоп Axiovert 200V (Carl Zeiss, Германия). Повышенным считали количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК $>15\%$ [1].

Стандартное спермиологическое исследование выполняли согласно рекомендациям руководства ВОЗ (2010) [2]. Для анализа были доступны образцы эякулята 117 и 97 мужчин 1-й и 2-й групп соответственно. Статистический анализ различий между группами выполняли с помощью t-критерия Стьюдента, принимая уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты

Распределение образцов эякулята по содержанию сперматозоидов с фрагментированной ДНК было близким к нормальному (рис. 1). Доля сперматозоидов

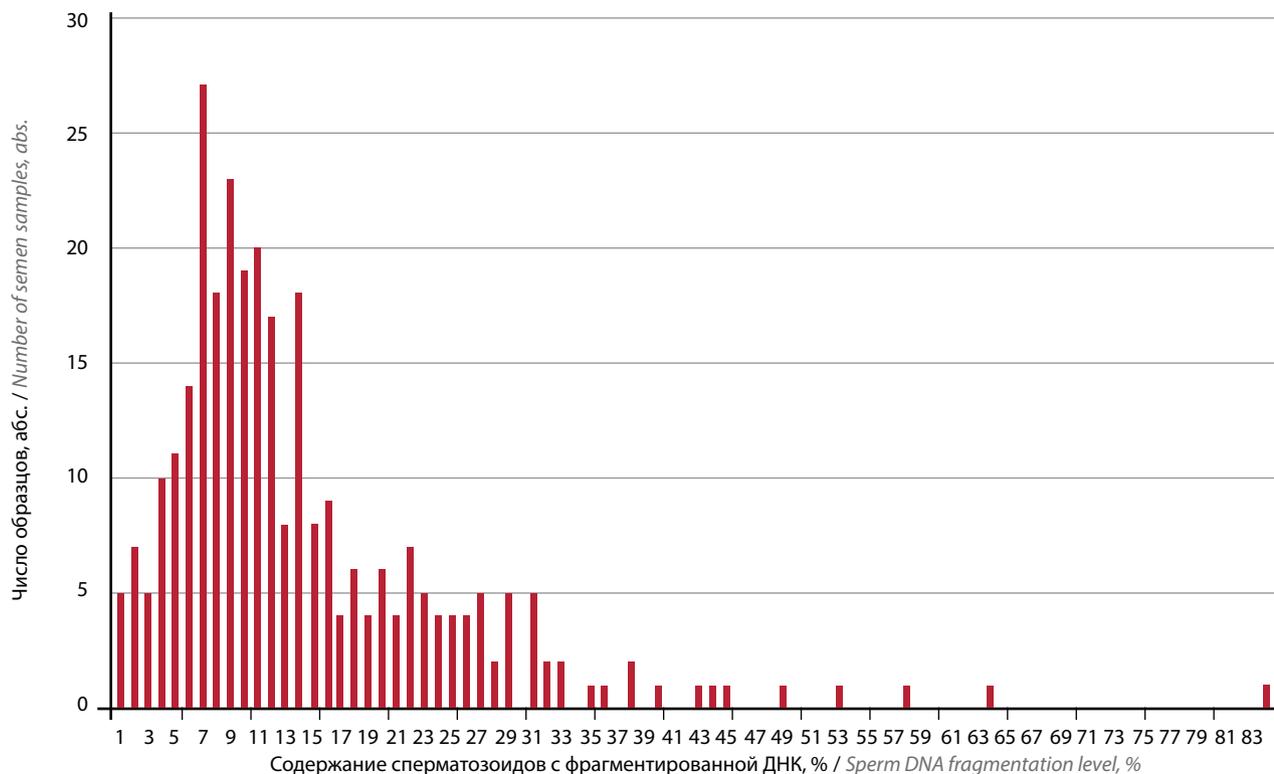


Рис. 1. Распределение образцов эякулята по содержанию сперматозоидов с фрагментированной ДНК

Fig. 1. Semen samples distribution per the level of sperm with fragmented DNA

с фрагментированной ДНК в образцах эякулята варьировала от 1,5 до 64,5 %. Среднее значение этого показателя в 1-й и 2-й группах составило $12,0 \pm 6,0$ и $16,1 \pm 8,3$ % соответственно. Содержание сперматозоидов с фрагментированной ДНК в 1-й группе статистически значимо ниже, чем во 2-й группе ($p < 0,05$) (рис. 2).

Среднее количество сперматозоидов в эякуляте в 1-й и 2-й группах составило $267,0 \pm 198,7$ и $201,0 \pm 162,9$ млн соответственно, причем в 1-й группе оно было статистически значимо больше, чем во 2-й группе ($p = 0,02$) (рис. 3). Среднее содержание прогрессивно-подвижных сперматозоидов составило в 1-й и 2-й группах соответственно $17,5 \pm 10,5$ и $15,3 \pm 9,5$ % (рис. 4), среднее содержание атипичных сперматозоидов — $94,9 \pm 3,9$ и $94,6 \pm 4,8$ %; между группами не выявлены статистически значимые различия ($p > 0,05$) (рис. 5).

Обсуждение

Проблема целостности генома мужских гамет актуальна для диагностики мужского бесплодия. В большинстве исследований показано, что содержание сперматозоидов с фрагментированной ДНК увеличивается с возрастом, однако имеются и данные об отсутствии влияния возраста на целостность ДНК. Таким образом, вопрос о связи возраста мужчин с уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов окончательно не решен, что, в первую очередь, может быть связано с особенностями выборки. Кроме того, результаты разных научных

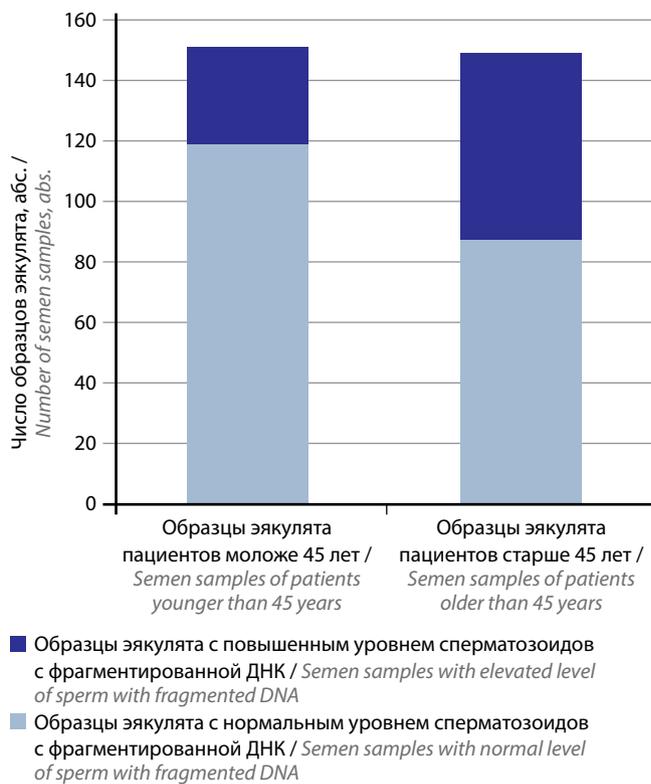


Рис. 2. Образцы эякулята пациентов разного возраста с фрагментацией ДНК сперматозоидов

Fig. 2. Number of semen samples of patients of different ages with fragmented DNA in spermatozoa

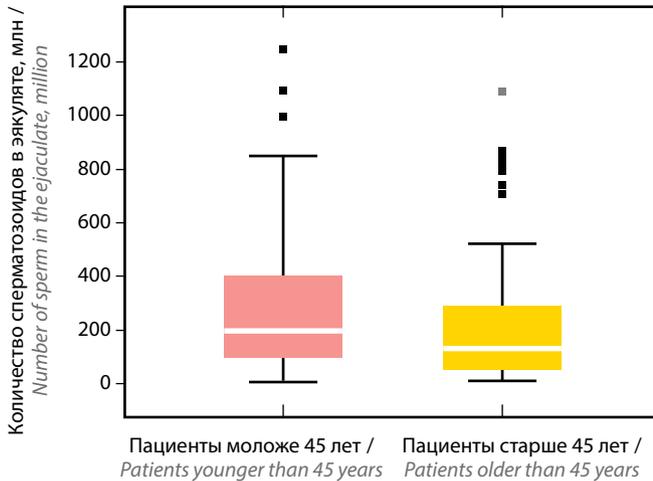


Рис. 3. Количество сперматозоидов в эякуляте у пациентов разных возрастных групп с нарушением фертильности

Fig. 3. Number of sperm in the ejaculate of patients of different age groups with sub- or infertility

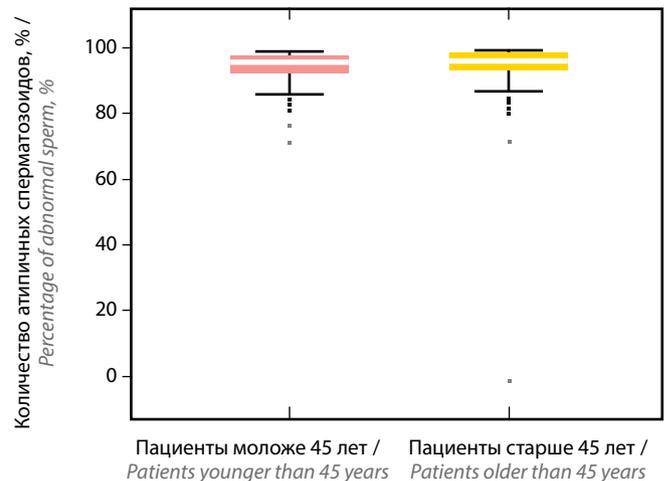


Рис. 5. Количество атипичных сперматозоидов у пациентов разных возрастных групп с нарушением фертильности

Fig. 5. Percentage of abnormal sperm in patients of different age groups with sub- or infertility

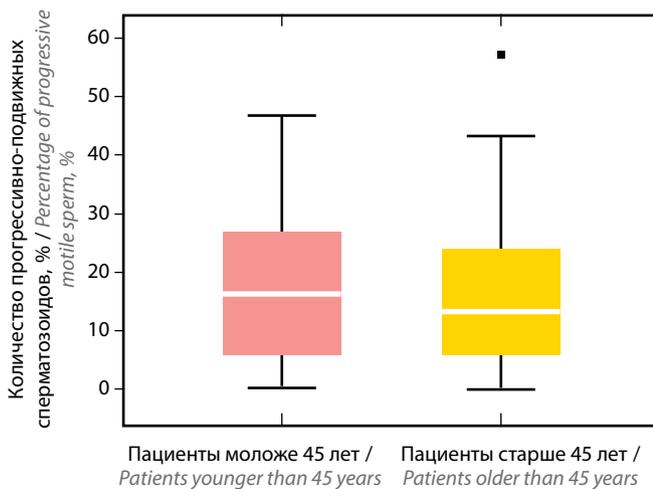


Рис. 4. Количество прогрессивно-подвижных сперматозоидов у пациентов разных возрастных групп с нарушением фертильности

Fig. 4. Percentage of progressive motile sperm in patients of different age groups with sub- or infertility

исследований сложно сопоставить вследствие различий в методах оценки фрагментации ДНК в мужских половых клетках.

В настоящее время распространено несколько методов, которые позволяют оценить целостность ДНК сперматозоидов. Методы для диагностики фрагментации ДНК сперматозоидов подразделяются на прямые и непрямые. С помощью прямых методов выявляются уже имеющиеся разрывы ДНК, в то время как непрямые методы позволяют оценить подверженность спермальной ДНК разрывам после внешнего неблагоприятного воздействия, например добавления кислот. Наиболее широко применяемые прямые методы – TUNEL, который основан на прямом мечении разрывов ДНК уридином, гель-электрофорез ДНК отдельных клеток

(single cell gel electrophoresis, также называемый comet) и анализ смещений разрывов (*in situ* nick translation assay). К наиболее известным непрямым методам относят проточную цитометрию с применением акридинового оранжевого (flow cytometric acridine orange assay), которая основана на метакроматических свойствах этого красителя, по-разному флуоресцирующего при связывании с однонитевыми (флуоресцирует красным) либо двуниевыми (флуоресцирует зеленым) разрывами ДНК. Непрямым методом является и исследование дисперсии хроматина сперматозоидов (sperm chromatin dispersion test). Несмотря на различия методов оценки нарушений, все они направлены на то, чтобы определить общее число сперматозоидов с фрагментацией ДНК независимо от участка генома, где это нарушение имело место [3].

Мы показали, что при оценке уровня фрагментации ДНК в сперматозоидах прямым методом (TUNEL) у мужчин старше 45 лет доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК статистически значимо больше, чем у мужчин моложе 45 лет. Это может косвенно свидетельствовать о повышенном уровне окислительного стресса, возникающем при нарушении баланса между количеством активных форм кислорода и концентрацией антиоксидантов в семенной жидкости.

С помощью метода TUNEL в ряде работ выявлена прямая зависимость уровня фрагментации ДНК от возраста мужчин [4–7], что согласуется с данными, полученными в нашем исследовании. Другие авторы не выявили корреляции с целостностью хроматина сперматозоидов [8, 9].

Используя другой базовый метод обнаружения повреждений ДНК сперматозоидов, основанный на метакроматических свойствах акридинового оранжевого, исследователи установили зависимость уровня

фрагментации ДНК сперматозоидов от возраста [10–12].

Подобная тенденция была выявлена N.P. Singh и соавт., использовавшими метод гель-электрофореза ДНК отдельных клеток [13]. Однако в работе T.E. Schmid и соавт. при использовании того же метода не выявили влияния возраста на количество двунитевых разрывов ДНК сперматозоидов [14].

T. Winkle и соавт. провели модифицированный анализ по Nicoletti [15] (после обработки йодидом пропидия фрагментацию ДНК в сперматозоидах оценивали методом проточной цитометрии) и не выявили статистически значимого увеличения уровня фрагментации ДНК сперматозоидов по мере увеличения возраста мужчин [16].

Поскольку процессы дифференцировки половых клеток в сперматогенном эпителии протекают непрерывно, процесс сперматогенеза уязвим на молекулярном, клеточном, тканевом и органном уровнях. Активные формы кислорода могут вызывать ошибки во время репликации ДНК, транскрипции или посттранскрипционных событий (фрагментацию, нарушение конденса-

ции хроматина, дефекты протаминизации) [17]. Такие повреждения связывают со старением многих тканей, в том числе и тканей яичек. Свободнорадикальная теория старения рассматривает этот процесс как результат накопления повреждений ДНК, вызванных окислительным стрессом. Чрезмерное количество активных форм кислорода и снижение антиоксидантной способности в процессе старения могут вызывать апоптоз или окислительное повреждение ДНК [18]. Выявлена положительная корреляция между уровнем H_2O_2 и уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов у пациентов с бесплодием [19, 20].

Заключение

У мужчин в возрасте старше 45 лет количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК статистически значимо больше, чем у мужчин в возрасте до 45 лет. Фрагментация ДНК отражает нарушение целостности генома сперматозоида и может служить важным диагностическим и прогностическим критерием оценки фертильности мужчин.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

1. Брагина Е.Е., Арифудин Е.А., Лазарева Е.М. и др. Нарушение конденсации хроматина сперматозоидов и фрагментация ДНК сперматозоидов: есть ли корреляция? Андрология и генитальная хирургия 2017;18(1):48–61. [Bragina E.E., Arifudin E.A., Lazareva E.M. et al. Abnormal chromatin condensation in spermatozoa and DNA fragmentation in spermatozoa: is there a correlation? *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2017;18(1):48–61. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2070-9781-2017-18-1-48-61.
2. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edn. Geneva: World Health Organization, 2010. 271 p.
3. Zini A., Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* 2006;175(5): 495–500. DOI: 10.1503/cmaj.060218.
4. Vagnini L., Baruffi R.L., Mauri A.L. et al. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online* 2007;15(5):514–9. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60382-3.
5. Plastira K., Msaouel P., Angelopoulou R. et al. The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 2007;24(10):437–43. DOI: 10.1007/s10815-007-9162-5.
6. Sati L., Ovari L., Bennett D. et al. Double probing of human spermatozoa for persistent histones, surplus cytoplasm, apoptosis and DNA fragmentation. *Reprod Biomed Online* 2008;16(4):570–9. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60464-6.
7. Petersen C.G., Mauri A.L., Vagnini L.D. et al. The effects of male age on sperm DNA damage: an evaluation of 2,178 semen samples. *JBRA Assist Reprod* 2018;22(4):323–30. DOI: 10.5935/1518-0557.20180047.
8. Brahem S., Mehdi M., Elghezal H., Saad A. The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *J Assist Reprod Genet* 2011;28(5):425–32. DOI: 10.1007/s10815-011-9537-5.
9. Colin A., Barroso G., Gómez-López N. et al. The effect of age on the expression of apoptosis biomarkers in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2010;94(7):2609–14. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.043.
10. Moskovtsev S.I., Willis J., Mullen J.B. Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril* 2006;85(2): 496–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.05.075.
11. Moskovtsev S.I., Willis J., White J., Mullen J.B. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology* 2009;74(4):789–93. DOI: 10.1016/j.urology.2009.05.043.
12. 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. DOI: 10.1073/pnas.0506468103.
13. Singh N.P., Muller C.H., Berger R.E. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003;80(6):1420–30. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2003.04.002.
14. Schmid T.E., Eskenazi B., Baumgartner A. et al. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod* 2007;22(1):180–7. DOI: 10.1093/humrep/del338.
15. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991;139(2):271–9. DOI: 10.1016/0022-1759(91)90198-o.
16. Winkle T., Rosenbusch B., Gagsteiger F. et al. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J Assist Reprod Genet* 2009;26(1):41–6. DOI: 10.1007/s10815-008-9277-3.
17. Agarwal A., Said T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA



- damage in male infertility. Hum Reprod Update 2003;9(4):331–45.
DOI: 10.1093/humupd/dmg027.
18. Aitken R.J., Clarkson J.S., Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biol Reprod 1989;41(1):183–97.
DOI: 10.1095/biolreprod41.1.183.
19. Zandieh Z., Vatannejad A., Doosti M. et al. Comparing reactive oxygen species and DNA fragmentation in semen samples of unexplained infertile and healthy fertile men. Ir J Med Sci 2018; 187(3):657–62.
DOI: 10.1007/s11845-017-1708-7.
20. Xie D., Lu C., Zhu Y. et al. Analysis on the association between sperm DNA fragmentation index and conventional semen parameters, blood microelements and seminal plasma ROS in male patients with infertility. Exp Ther Med 2018;15(6):5173–6.
DOI: 10.3892/etm.2018.6115.

Вклад авторов

С.Ш. Хаят: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста статьи;
Е.Е. Брагина: разработка дизайна исследования, критические замечания, научное редактирование текста статьи;
Е.А. Арифупин, Е.М. Лазарева: получение данных для анализа, научное редактирование текста статьи;
Т.М. Сорокина: анализ публикаций по теме статьи, написание текста статьи;
Л.Ф. Курило, В.Б. Черных: анализ публикаций по теме статьи, критические замечания, научное редактирование текста статьи.

Authors' contributions

S.Sh. Khayat: reviewing of publications on the article's theme, analysis of the obtained data, article writing;
E.E. Bragina: development of research design, critical comments, scientific editing of the article;
E.A. Arifulin, E.M. Lazareva: obtaining data for analysis, scientific editing of the article;
T.M. Sorokina: reviewing of publications on the article's theme, article writing;
L.F. Kurilo, V.B. Chernykh: reviewing of publications on the article's theme, critical comments, scientific editing of the article.

ORCID авторов/ORCID of authors

С.Ш. Хаят/S.Sh. Khayat: <https://orcid.org/0000-0002-0535-4081>
Е.Е. Брагина/E.E. Bragina: <https://orcid.org/0000-0002-8422-4962>
Е.А. Арифупин/E.A. Arifulin: <https://orcid.org/0000-0002-3695-4215>
Е.М. Лазарева/E.M. Lazareva: <https://orcid.org/0000-0002-0494-483X>
Т.М. Сорокина/T.M. Sorokina: <https://orcid.org/0000-0002-4618-2466>
Л.Ф. Курило/L.F. Kurilo: <https://orcid.org/0000-0003-3603-4838>
В.Б. Черных/V.B. Chernykh: <https://orcid.org/0000-0002-7615-8512>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России.

Financing. The study was performed in the framework of the state task of the Ministry of Education and Science of Russia.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.