

Комплексное сперматологическое обследование пациентов с муковисцидозом без обструкции семявыносящих путей

А.О. Седова¹, М.И. Штаут¹, Е.Е. Брагина^{1,2}, С.А. Репина¹, Т.М. Сорокина¹, Л.Ф. Курило¹, В.Б. Черных¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. 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

Контакты: Вячеслав Борисович Черных chernykh@med-gen.ru

Цель исследования — оценить параметры эякулята, количественные и качественные показатели сперматозоидов, их ультраструктуру и состояние хроматина у пациентов с муковисцидозом без азооспермии и двусторонней непроходимости семявыносящих путей.

Материалы и методы. Обследованы 5 мужчин с муковисцидозом без непроходимости семявыносящих путей. Проведено стандартное спермиологическое исследование, количественный кариологический анализ незрелых половых клеток в осадке эякулята, электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов, определен уровень фрагментации ДНК сперматозоидов методом TUNEL, биохимический анализ эякулята.

Результаты. У 2 пациентов выявлена астенотератозооспермия, у 1 — олигоастенотератозооспермия, у 1 — астенозооспермия и у 1 — нормозооспермия. Олигоспермия наблюдалась у 2 пациентов, повышенная вязкость эякулята — у 1. Уровень рН эякулята составил 7,0–7,8, содержание фруктозы в эякуляте было снижено в 1 из 2 исследованных образцов. При количественном кариологическом анализе незрелых половых клеток у всех пациентов выявлены признаки частичного блока сперматогенеза в профазе I мейоза. При электронно-микроскопическом исследовании обнаружено повышенное количество атипичных головок сперматозоидов, повышенное содержание сперматозоидов с прореагировавшей акросомой и с неконденсированным хроматином. Повышенное содержание сперматозоидов с фрагментацией ДНК выявлено у 1 пациента.

Заключение. У пациентов с муковисцидозом без непроходимости семявыносящих путей выявлены индивидуальные различия в нарушениях сперматозоидов и сперматологических диагнозах (от нормозооспермии до олигоастенотератозооспермии). Не обнаружено специфических морфологических аномалий сперматозоидов. Олигоспермия и сниженное количество фруктозы в эякуляте свидетельствуют о поражении семенных пузырьков у пациентов с муковисцидозом без обструкции семявыносящих протоков.

Ключевые слова: муковисцидоз, мужское бесплодие, семявыносящие протоки, сперматогенез, сперматозоиды

Для цитирования: Седова А.О., Штаут М.И., Брагина Е.Е. и др. Комплексное сперматологическое обследование пациентов с муковисцидозом без обструкции семявыносящих путей. Андрология и генитальная хирургия 2020;21(3):44–55.

DOI: 10.17650/2070-9781-2020-21-3-44-55



Comprehensive semen examination in cystic fibrosis patients without seminal ducts obstruction

A.O. Sedova¹, M.I. Shtaut¹, E.E. Bragina^{1,2}, S.A. Repina¹, T.M. Sorokina¹, L.F. Kurilo¹, V.B. Chernykh¹

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

The study objective is to evaluate the semen parameters, quantitative and qualitative characteristics of spermatozoa, sperm ultrastructure and chromatin status in cystic fibrosis patients with preserved seminal ducts.

Materials and methods. We examined 5 cystic fibrosis patients without bilateral obstruction of the vas deferens. Patients underwent standard semen analysis, quantitative karyological analysis of immature germ cells from the ejaculate sediment and transmission electronic microscopy of spermatozoa.

Results. Of 5 patients, 2 were asthenoteratozoospermic, 1 patient was oligoastenozoospermic, 2 patients were asthenozoospermic and 1 was normozoospermic. Oligospermia was detected in 2 samples; increased viscosity of ejaculate was in 1 sample. The pH of the ejaculate was 7.0–7.8; the fructose of the ejaculate was low in one of 2 examined samples. However, oligospermia and low fructose concentration are only indirect signs of aplasia/hypoplasia to the seminal vesicles, since these patients did not perform instrumental visualization of the prostatovesicular complex. Signs of partial meiotic arrest were revealed in all patients examined using quantitative karyological analysis of immature germ cells. An increased number of abnormal sperm heads, activated acrosomes, an increased content of "immature" chromatin in sperm nuclei were found by transmission electronic microscopy. Sperm DNA fragmentation was increased (32 %, normal range ≤15 %) in 1 of 2 asthenoteratozoospermic patients.



Conclusion. We found various sperm abnormalities and spermatology diagnoses (from normozoospermia to oligoasthenoteratozoospermia) in cystic fibrosis patients without semen ducts obstruction. No specific sperm morphology abnormalities were found. Oligospermia and a low ejaculate fructose indicate impaired seminal vesicles in some cystic fibrosis patients with no obstruction of the vas deferens.

Key words: cystic fibrosis, male infertility, vas deferens, spermatogenesis, sperm

For citation: Sedova A.O., Shtaut M.I., Bragina E.E. et al. Comprehensive semen examination in cystic fibrosis patients without seminal ducts obstruction. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2020;21(3):44–55. (In Russ.).

Введение

Муковисцидоз — одно из наиболее частых моногенных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, которое характеризуется прогрессирующим течением и поражением желез внешней и смешанной секреции, в первую очередь трахеобронхиального дерева и поджелудочной железы. В соответствии с этим выделяют легочную и смешанную формы муковисцидоза. Распространенность этого заболевания в России составляет в среднем 1 случай на 8–10 тыс. человек [1].

Причиной развития муковисцидоза и связанных с ним заболеваний считается нарушение транспорта ионов хлора через клеточную мембрану, вызванное мутациями гена *CFTR*, который кодирует белок — регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе (cystic fibrosis transmembrane regulator, CFTR), функционирующий как мембранный хлорный канал [2].

В зависимости от степени снижения продукции белка CFTR и нарушения его функции мутации гена *CFTR* подразделяют на «тяжелые» и «мягкие». Для легочной формы муковисцидоза характерны генотипы с наличием 1 или 2 «мягких» мутаций *CFTR*. Одной из частых «мягких» мутаций гена *CFTR* является мутация 3849+10kbC>T, при которой сохраняется проходимость семявыносящих протоков [3–9].

По данным научной литературы, 95–98 % пациентов мужского пола с муковисцидозом страдают бесплодием вследствие обструктивной азооспермии [1, 3–7]. Нарушение функции белка CFTR приводит к недоразвитию семявыносящих путей у мужчин с муковисцидозом или с изолированным дву- или односторонним поражением семявыносящих протоков — синдромами CBAVD (congenital bilateral aplasy of vas deferens) и CUAVD (congenital unilateral aplasy of vas deferens). У 90 % мужчин, страдающих муковисцидозом, в результате нарушения проходимости семявыносящих путей развиваются такие тяжелые формы патозооспермии, как азооспермия, криптозооспермия, а также выраженная олигоспермия. Характерными сперматологическими признаками обструкции семявыносящих путей при муковисцидозе и синдроме CBAVD является снижение объема эякулята (<1,5 мл), pH (<7,0) и содержания фруктозы в эякуляте, у некоторых пациентов наблюдается повышение

вязкости эякулята [4–8]. В редких случаях у мужчин с муковисцидозом указанные признаки отсутствуют.

Помимо обструкции семявыносящих путей и аплазии семенных пузырьков, мутации гена *CFTR* могут обуславливать нарушение функции соматических клеток яичек (клеток Сертоли и Лейдига), дифференцировки и развития мужских половых клеток, ухудшение оплодотворяющей способности сперматозоидов [3].

Сперматогенез у большинства пациентов с муковисцидозом и синдромом CBAVD обычно не нарушен [9, 10]. Вместе с тем в некоторых случаях у пациентов с муковисцидозом и мужчин без него, имеющих синдром CBAVD, обнаруживают сперматологические и гистологические признаки нарушения спермато- и спермиогенеза, снижения оплодотворяющей способности сперматозоидов [10]. В связи с этим у мужчин с муковисцидозом без обструктивной азооспермии, имеющих другие сперматологические нарушения, может снижаться фертильность.

У тех немногих мужчин с муковисцидозом, которые не имеют обструкции семявыносящих путей, возможно проанализировать состояние сперматогенеза, количественные и качественные параметры половых клеток с использованием стандартного спермиологического исследования, электронной микроскопии сперматозоидов и дополнительных сперматологических тестов. Однако подобные комплексные исследования у пациентов с муковисцидозом, имеющих сохранную проходимость семявыносящих протоков, практически не проводились ранее, а влияние белка CFTR на ткань яичек, сперматогенез, мейоз, деление и созревание мужских половых клеток, морфологические показатели, подвижность и другие фертильные свойства сперматозоидов недостаточно изучено.

Цель исследования — оценить параметры эякулята, количественные и качественные показатели сперматозоидов, включая их ультраструктуру и состояние хроматина, у пациентов с муковисцидозом без азооспермии и непроходимости семявыносящих путей.

Материалы и методы

Для проведения исследования отобраны 5 мужчин (русских) с муковисцидозом, не являющихся родственниками. У этих пациентов по данным сперматологического



обследования не выявлено признаков двусторонней обструкции семявыносящих путей (обструктивной азооспермии). У всех из них диагностирована легочная форма муковисцидоза, верифицированного путем молекулярно-генетического исследования. Возраст пациентов варьировал от 16 до 29 лет (средний возраст $22,6 \pm 5,0$ года). На момент обследования в браке состоял 1 мужчина; детей (или беременностей партнерши) не было в анамнезе ни у одного пациента. Проведено комплексное обследование; признаков гормональных нарушений, варикоцеле, крипторхизма, инфекций, передающихся половым путем, и других факторов риска не выявлено.

От всех обследованных получено добровольное письменное информированное согласие на участие в данном исследовании, одобренном биоэтическим комитетом при ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова».

Биологическим материалом являлись образцы нативного эякулята, полученные путем мастурбации и собранные в пластиковые контейнеры.

Стандартный спермиологический анализ выполняли в соответствии с руководством Всемирной организации здравоохранения (2010) [11]. Количественный кариологический анализ незрелых половых клеток из осадка эякулята проводили по собственному запатентованному методу [12], детально описанному в предыдущих публикациях [13].

Выборка пациентов невелика, поскольку почти у всех пациентов с муковисцидозом развивается азооспермия.

Спермиологическое исследование выполнено у каждого пациента 1 раз. Отсутствие повторного исследования объясняется рядом причин: местом жительства пациентов (они приезжали в Москву для госпитализации в связи с основным заболеванием), тяжестью самого заболевания, нежеланием пациентов проходить повторное исследование и др.

При количественном электронно-микроскопическом исследовании сперматозоидов оценивали следующие показатели: количество головок с нормальной морфологией, наличие акросомы, ее форму, расположение и содержимое, форму ядра, состояние хроматина, наличие цитоплазматических капель на головке и шейке сперматозоида, ультраструктуру митохондрий, аксонемы и периаксонемных структур жгутика. Детально методика описана ранее [14].

Фрагментацию ядерной ДНК в сперматозоидах определяли методом флуоресцентного мечения одно- и двунитевых разрывов ДНК (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) в мазках эякулята [15, 16]. В качестве референсного значения принято количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК не более 15 %.

Биохимическое исследование семенной жидкости выполнено на 2 образцах эякулята, полученных от разных

пациентов. Определяли содержание фруктозы в соответствии с руководством Всемирной организации здравоохранения (2010) [11] с использованием диагностических наборов FertiPro Fructose Test по протоколу производителя (FertiPro NV, Бельгия). За норму принимали общее количество фруктозы в эякуляте, равное 13 мкмоль (2,4 мг) (по данным T.G. Cooreg и соавт. [17], приведенным в вышеупомянутом руководстве [11]).

Биохимический анализ эякулята и определение количества сперматозоидов с фрагментацией ДНК выполнены только у 2 из 5 пациентов в связи с недоступностью материала для соответствующих исследований у остальных.

Результаты проанализированы методами описательной статистики с использованием программы Excel из пакета программ Microsoft Office 2016 (Microsoft Inc., США).

Результаты

У 2 из 5 пациентов с муковисцидозом выявлена астено-тератозооспермия, у 1 – олигоастено-тератозооспермия, у 1 – астенозооспермия и у 1 – нормозооспермия (табл. 1). В образце эякулята, полученном от пациента с олигозооспермией, концентрация сперматозоидов составила 64 млн/мл, однако вследствие выраженной олигоспермии (объем эякулята 0,3 мл) общее количество сперматозоидов у него было ниже нормы. У пациента 59098 с астено-тератозооспермией концентрация и общее количество сперматозоидов существенно превышали норму; данное отклонение характерно для полизооспермии.

Наблюдаемая у 3 пациентов (41463, 59098, 60664) легкая лейкоспермия (2,0–2,2 млн/мл), по-видимому, может быть объяснена хроническим воспалительным процессом в связи с основным заболеванием. Обследованные пациенты не имели инфекций, передаваемых половым путем, или признаков воспаления мочевого тракта.

Объем эякулята менее референсных значений (<1,5 мл) выявлен у 2 пациентов (49465 и 60664), у 1 пациента (41463) он был близок к нижней границе нормы. Вязкость семенной жидкости была повышена только в 1 образце (49465). Уровень pH эякулята у всех пациентов был в пределах нормальных значений.

Содержание фруктозы в семенной жидкости определено в 2 образцах эякулята. Показатель общего количества был снижен у пациента с олигоспермией (60664, объем 0,3 мл, концентрация фруктозы 1,12 мг/мл, общее количество фруктозы 0,336 мг), а у другого пациента (59098, объем 6 мл) находился в пределах референсных значений (концентрация фруктозы 0,85 мг/мл, общее количество 5,1 мг).

Формы морфологической атипичности сперматозоидов (табл. 2), обнаруженные при светооптической микроскопии, у всех пациентов имели гетерогенный характер: обнаружены различные формы структурных аномалий гамет.

Таблица 1. Результаты спермиологического исследования у пациентов с муковисцидозом без обструкции семявыносящих путей

Table 1. Results of standard sperm examination of patients with cystic fibrosis without semen ducts obstruction

Показатель Characteristic	Пациент 34062 Patient 34062	Пациент 41463 Patient 41463	Пациент 49465 Patient 49465	Пациент 59098 Patient 59098	Пациент 60664 Patient 60664
Генотип по гену <i>CFTR</i> <i>CFTR</i> genotype	3849+10kbC>T/ Q493R	CFTRdele2,3/3849+ 10kbC>T	F508del/3849+ 10kbC>T	F508del/3849+ 10kbC>T	F508del/3849+ 10kbC>T
Возраст пациента, лет Patient age, years	19	24	25	29	16
Длительность полового воздержания, сут Duration of sexual abstinence, days	11	6	8	15	5
Объем эякулята, мл Ejaculate volume, ml	3,5	1,6	1,0	6,0	0,3
pH эякулята, ед. Ejaculate pH, units	7,5	7,0	7,8	7,4	7,8
Вязкость эякулята, мм Ejaculate viscosity, mm	10	5	60	10	5
Концентрация сперматозоидов, млн/мл Sperm concentration, million/ml	158,0	77,2	243,0	204,0	64,0
Общее количество сперматозоидов, млн Total sperm count, millions	553,0	123,5	243,0	1224,0	19,2
Доля живых сперматозои- дов, % Percentage of live sperm, %	92	63	98	95	93
Доля сперматозоидов с нормальной морфологи- ей, % Percentage of sperm with normal morphology, %	12	4	0	1	2
Доля сперматозоидов с про- грессивно-поступательным движением, % Progressive motile sperm, %	39	17	2	9	25
Доля сперматозоидов с непрогрессивным движе- нием, % Non-progressive motile sperm, %	10	14	18	15	11
Количество лейкоцитов, млн/мл Leukocyte count, million/ml	1,0	2,2	0,5	2,0	2,0
Сперматологический диагноз Spermatological diagnosis	Нормозоо- спермия Normozoos- permia	Астенозоо- спермия, лейкоспермия Asthenozoospermia, leukospermia	Астенотерато- зооспермия, олигоспермия Asthenoteratozoo- spermia, oligospermia	Астенотера- тозооспермия, лейкоспермия Asthenoteratozoo- spermia, leukospermia	Олигостенотера- тозооспермия, олигоспермия, лейкоспермия Oligoasthenoteratozoo- spermia, oligospermia, leukospermia

Таблица 2. Результаты морфологического исследования сперматозоидов у пациентов с легочной формой муковисцидоза без обструкции семявыносящих путей

Table 2. The results of a morphological study of sperm in patients with pancreas-sufficient form of cystic fibrosis without semen ducts obstruction

Показатель Characteristic	Пациент 34062 Patient 34062	Пациент 41463 Patient 41463	Пациент 49465 Patient 49465	Пациент 59098 Patient 59098	Пациент 60664 Patient 60664
Генотип по гену <i>CFTR</i> <i>CFTR</i> genotype	Q493R/3849+ 10kbC>T	CFTRdele2,3/3849+ 10kbC>T	F508del/3849+ 10kbC>T	F508del/3849+ 10kbC>T	F508del/3849+ 10kbC>T
Морфологически нормальные сперматозоиды, % Percentage of sperm with normal morphology, %	12	4	0	1	2
Атипия жгутика, % Atypical flagellum, %	16	32	5	15	11
Аморфная головка, % Amorphous head, %	11	13	25	8	9
Круглая головка, % Round head, %	11	0	0	0	3
Аморфная головка + атипия жгутика, % Amorphous head + atypical flagellum, %	6	27	10	21	0
Капля на шейке + атипия жгутика, % Cytoplasmic drop + atypical flagellum, %	0	19	0	4	0
Макроголовка, % Macrocephaly, %	0	0	2	0	3
Капля на шейке, % Cytoplasmic drop, %	10	0	0	0	0
Удлиненная головка, % Elongated head, %	6	0	8	0	3
Капля на шейке + нарушения в акросоме, % Cytoplasmic drop + acrosomal changes, %	0	0	0	4	3
Гетероаксиальность, % Heteroaxial sperm, %	7	0	2	32	22
Нарушения в акросоме, % Acrosome abnormalities, %	26	12	21	9	6
Микроголовка, % Microcephaly, %	0	0	7	0	3
Нарушения в акросоме + атипия жгутика, % Acrosome abnormalities + atypical flagellum, %	7	0	20	7	13

Таблица 3. Результаты количественного кариологического анализа незрелых половых клеток у пациентов с муковисцидозом без обструкции семявыносящих путей

Table 3. Results of quantitative karyological analysis of immature germ cell in cystic fibrosis patients without semen ducts obstruction

Показатель Characteristic	Пациент 34062 Patient 34062	Пациент 49465 Patient 49465	Пациент 59098 Patient 59098	Пациент 60664 Patient 60664	Референсные значения* Reference values*
Генотип по гену <i>CFTR</i> <i>CFTR</i> genotype	3849+10kbC>T/ Q493R	F508del/3849+ 10kbC>T	F508del/3849+ 10kbC>T	F508del/3849+ 10kbC>T	—
Индекс незрелых половых клеток, % Immature germ cells index, %	7,4	10,0	1,0	1,0	2,0–4,0
Сперматоциты I (прелептотена, зиготена), % Spermatocytes I (preleptotene, zygotene), %	2,3	3,0	3,0	7,0	0,66 ± 0,16
Сперматоциты I (пахитена), % Spermatocytes I (pachytene), %	4,7	0	1,0	0	0,45 ± 0,10
Сперматоциты I (диплотена), % Spermatocytes I (diplotene), %	1,5	0	2,0	0	1,11 ± 0,26
Сперматоциты I (диакинез, MI, MII), % Spermatocytes I (diakinesis, MI, MII), %	0	0	0	0	0,04 ± 0,02
Сперматоциты II, % Spermatocytes II, %	87,0	84,0	87,0	77	91,99 ± 0,89
Нерасхождение ядер сперматид, % Spermatid nuclei nondisjunction, %	16,0	16,0	2,0	9,0	22,98 ± 2,65
Неидентифицируемые незрелые половые клетки, % Non-identifiable immature germ cells, %	4,5	13,0	7,0	16,0	5,85 ± 0,85

*В качестве референсных значений использовали данные из работы Л.Ф. Курило и соавт. [12].

*Reference values were taken from L. F. Kurilo et al. [12].

Не все сперматологические изменения, выявленные у пациентов с муковисцидозом, могут быть обусловлены данным заболеванием. Возможно, определенную роль играет лечение, генотип (не только вариант гена *CFTR*), возраст и другие факторы, однако оценить их вклад на данной выборке не представлялось возможным.

Выполнен количественный кариологический анализ незрелых половых клеток в 4 образцах эякулята (табл. 3). Сперматозоиды и незрелые половые клетки обнаружены в осадке во всех 4 образцах. Повышенный по сравнению с референсными значениями индекс незрелых половых клеток выявлен у 2 пациентов (34062, 49465). Во всех исследованных образцах эякулята в осадке наблюдалось повышенное количество сперматоцитов в профазе I мейоза (3,0–8,5 % от общего числа обнаруженных незрелых половых клеток), находящихся на допахитенных стадиях развития (в прелептотене, зиготене), а у 2 пациентов (34062, 59098) и в пахитене, диплотене, при сниженном количестве сперматоцитов II. Кроме того, в 2 образцах отмечено повышенное (в 2,0–2,5 раза)

количество неидентифицированных (дегенерирующих) половых клеток (см. табл. 3). Таким образом, признаки частичного блока сперматогенеза в профазе I мейоза выявлены у всех 4 пациентов, у которых выполнен количественный кариологический анализ незрелых половых клеток.

Количество сперматозоидов с интактными головками варьировало от 1 до 4 %, при этом в 2 образцах (41463 и 49465) этот показатель был на нижней границе нормы, в 3 образцах (34062, 59098 и 60664) выявлено повышенное количество гамет с атипичными головками. В 3 образцах (41463, 49465 и 59098) было повышено количество сперматозоидов с прореагировавшей акросомой (табл. 4). По сравнению с референсными показателями также было повышено содержание сперматозоидов с неконденсированным («незрелым») хроматином в образцах эякулята 2 пациентов (41463 и 59098) – соответственно 45 и 53 % (табл. 4, рис. 1, 2).

При выполнении электронной микроскопии сперматозоидов в качестве дополнительных включений

Таблица 4. Результаты электронной микроскопии сперматозоидов у пациентов с легкой формой муковисцидоза и сохранной проходимость семявыносящих протоков
Table 4. Results of transmission electron microscopy of sperm in cystic fibrosis patients without seminal ducts obstruction

Показатель Characteristic	Референсные значения* Reference values*	Пациент 34062 Patient 34062	Пациент 41463 Patient 41463	Пациент 49465 Patient 49465	Пациент 59098 Patient 59098	Пациент 60664 Patient 60664
Генотип по гену <i>CFTR</i> <i>CFTR</i> genotype	—	Q493R/3849+ 10kbC>T	CFTRdel2,3/3849+ 10kbC>T	F508del/3849+ 10kbC>T	F508del/3849+ 10kbC>T	F508del/3849+ 10kbC>T
Нормальное положение, % Normal localization, %	≥40	74	78	86	84	77
Расположена далеко от ядра, % Located far from the nucleus, %	—	18	22	14	15	23
Нормальный размер, % Normal size, %	—	35	43	46	31	30
Уменьшенный размер, % Small size, %	—	56	56	54	68	70
Среагировавшая, % Reacted, %	≤20	7	27	30	39	12
Конденсированный, % Condensed ("mature"), %	≥30	78	55	82	47	85
Неконденсированный, % Non-condensed ("immature"), %	≤30	22	45	18	53	15
Разрушенный, % Degraded, %	—	1	11	6	26	11
Интактные головки Intact heads	≥4	3	4	4	1	2
Присутствуют, % Present, %	—	17	10	9	17	20
Отсутствуют, % Absent, %	—	83	90	91	83	80
Нормальная форма, % Normal shape, %	≥80	58	96	95	57	91
Раздутая форма, % Swollen shape, %	—	42	4	5	47	9
Нормальное строение, % Normal structure, %	—	98	48	91	71	92
Дезорганизация, % Disorganisation, %	—	—	28	1	7	—

Окончание табл. 4
End of table 4

Показатель Characteristic	Референсные значения* Reference values,*	Пациент 34062 Patient 34062	Пациент 41463 Patient 41463	Пациент 49465 Patient 49465	Пациент 59098 Patient 59098	Пациент 60664 Patient 60664
Наружные плотные фибриллы Outer dense fibrils	Нормальные, % Normal, %	92	87	96	87	100
	Аномальные, % Abnormal, %	1	12	96	12	—
Фиброзная оболочка Fibrous sheath	Нормальная, % Normal, %	100	64	96	90	100
	Плохо собранная, % Poorly structured, %	—	37	—	9	—
Проксимальная центриоль Proximal centriole	Нормальная Normal	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1

* Референсные значения взяты из работы Е.Е. Брагиной, Е.Н. Бочаровой [16].
* Reference values were taken from E.E. Bragina, E.N. Vocharova [16].

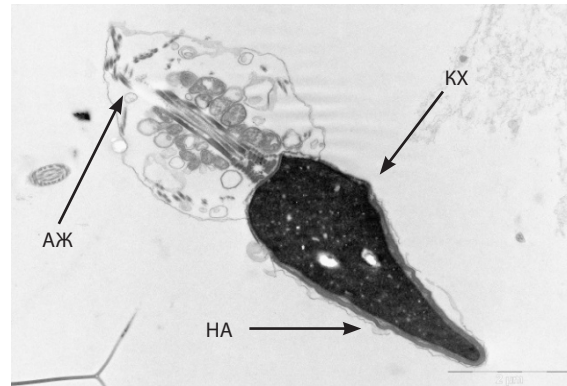


Рис. 1. Электронно-микроскопическое исследование (пациент №41463). Сперматозоид с нормальной головкой, конденсированным хроматином (КХ), атипичией жгутика (АЖ) и нормальной акросомой (НА)

Fig. 1. Electron microscopic examination (patient 41463). Spermatozoon with normal head, condensed chromatin (KX), atypical flagellum (AJ) and normal acrosome (HA)

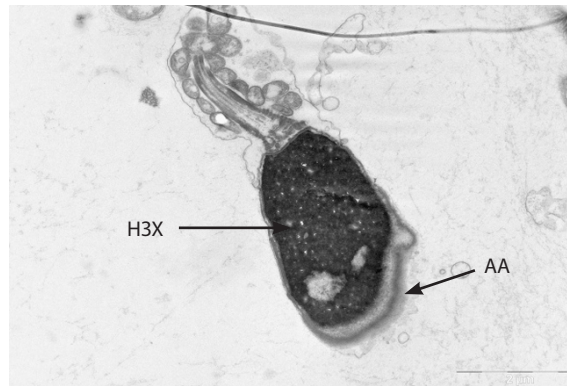


Рис. 2. Электронно-микроскопическое исследование (пациент 41463). Сперматозоид с аморфной головкой, незрелым хроматином (H3X) и аномальной акросомой (AA)

Fig. 2. Electron microscopic examination (patient 41463). Spermatozoon with amorphous head, immature chromatin (H3X) and abnormal acrosome (AA)

были обнаружены незрелые половые клетки, нейтрофилы, спермиофаги, в 2 образцах (34062 и 59098) – вирусы и в 1 (60664) – микроколонии бактерий.

В образцах эякулята 2 пациентов с генотипом F508del/3849+10kbC>T методом TUNEL определено количество сперматозоидов с фрагментацией ядерной ДНК. В эякуляте пациента 60664 количество гамет с фрагментированной ДНК составило 4 % (норма). В эякуляте пациента 59098 (астенотератозооспермия по результатам спермиологического обследования) выявлено повышенное количество сперматозоидов с фрагментацией ДНК (32 % при норме $\leq 15\%$), что рассматривается как фактор нарушения мужской фертильности и увеличения риска невынашивания на раннем сроке [16].

Обсуждение

Обструктивная форма азооспермии встречается у примерно у 90 % пациентов с муковисцидозом [3, 4, 18]. В настоящей работе наличие непроходимости семявыносящих путей было критерием исключения из исследования. Выраженная олигоспермия и повышенная кислотность (рН) эякулята, характерные для пациентов с муковисцидозом, не выявлены у большей части пациентов с отсутствием непроходимости. Содержание фруктозы в эякуляте варьировало от нормы до сниженного.

Олигоспермия отмечена у 2 пациентов с муковисцидозом, однако выраженного снижения кислотности эякулята не отмечено ни в одном из образцов, в том числе у пациента с выраженной олигоспермией (0,3 мл), у которого также диагностирована олигоастенотератозооспермия. Содержание фруктозы в его образце семенной жидкости было существенно ниже референсного значения. Это указывает на выраженное снижение секреции жидкости семенными пузырьками, очевидно вследствие их аплазии. Возможно, у данного пациента имеется частичное нарушение проходимости (процесс аплазии/атрофии развивается с одной или с обеих сторон, приводя к неполному нарушению проходимости) семявыносящих протоков, в частности, односторонняя их непроходимость. Пациенты с синдромом CUAVD или частичным поражением семявыносящих протоков могут не иметь азооспермии или тяжелой олигозооспермии. Выраженность атрофии семенных пузырьков при этом также варьирует [19].

Влияние гена *CFTR* на сперматогенез изучено недостаточно. В ряде работ показано, что мужчины с муковисцидозом могут иметь нормальный сперматогенез [20] либо сниженную концентрацию сперматозоидов [21]. Однако исследование на лабораторных животных (мышях) показало уменьшение объема яичек у мышей с геном *CFTR*, что может свидетельствовать о дефектном сперматогенезе [22]. Кроме того, в этом исследовании показано влияние гена *CFTR* на сигнальные пути, которые важны для регуляции сперматогенеза. Очевидно, белок CFTR необходим не только для нормального развития семявыносящих протоков и семенных пузырьков и функционирования придаточных половых желез у мужчин, но и играет определенную роль в сперматогенезе [23]. Значительная экспрессия гена *CFTR* обнаружена в эпителии придатка яичка и семявыносящих протоков [24]. S. Viville и соавт. обнаружили изменений в извитых семенных канальцах, мембранах и интерстии у 7 из 11 мужчин с синдромом CUAVD [25]. У остальных 4 пациентов отмечено незначительное уменьшение количества интерстициальной паренхимы, нерегулярное заполнение в извитых семенных канальцах, снижение плотности половых клеток, отслоение и некроз герминативного эпителия

и умеренно выраженное утолщение *tunica propria* [25]. Следует также учитывать, что изменения в ткани яичек и их придатков могут быть вызваны самой обструкцией семявыносящих путей, наблюдаемой при обструктивной форме азооспермии различной этиологии [4]. Гистологических исследований ткани яичек у мужчин с муковисцидозом, не имеющих азооспермии и синдрома CUAVD, не проводилось, поэтому полученные нами данные о состоянии сперматогенеза, в том числе результаты количественного кариологического анализа незрелых половых клеток, уникальны. Признаки частичного блока сперматогенеза на допахитенных стадиях профазы I мейоза и в пахитене выявлены у всех 4 пациентов, у которых выполнен количественный кариологический анализ незрелых половых клеток.

Выявленные сперматологические нарушения, в частности нарушения мейоза, повышенное количество дегенерирующих клеток у пациентов с муковисцидозом без обструкции семявыносящих путей свидетельствуют о частичном нарушении созревания мужских половых клеток, однако у большинства обследованных нами мужчин с муковисцидозом с сохранной проходимостью семявыносящих путей количество сперматозоидов в эякуляте было нормальным.

Важно отметить, что у всех обследованных мужчин с муковисцидозом в генотипе имеется мутация 3849+10kbC>T гена *CFTR*. При отсутствии выраженной патозооспермии у пациентов с сохранной проходимостью семявыносящих протоков беременность может наступить и при естественном оплодотворении. У мужчин с мутацией 3849+10kbC>T наблюдаются более «мягкие» сперматологические нарушения, чем у пациентов с муковисцидозом, не имеющих данный вариант гена *CFTR* [4]. У 3 из 5 обследованных эта мутация находилась в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией F508del. У 2 из них выявлена астенотератозооспермия, у 1 — олигоастенотератозооспермия. Как у пациентов с генотипом F508del/3849+10kbC>T, так и у мужчин с другим генотипом по гену *CFTR* не отмечено преобладания каких-либо форм атипичии сперматозоидов. Сперматологические изменения, выявленные при количественном ультраструктурном анализе сперматозоидов, так же как и формы атипичии, обнаруженные с помощью светооптической микроскопии, имели переменный, гетерогенный характер.

Помимо прямого патогенного влияния мутаций *CFTR* на ткань яичек и герминативный эпителий, созревание сперматозоидов в придатке яичка и секрецию придаточных половых желез (придаток яичка, семенные пузырьки, предстательная железа), следует учитывать отрицательное воздействие экстрагенитальных поражений при муковисцидозе и массивной лекарственной терапии. Они оказывают негативный эффект на сперматогенез, ухудшают сперматологические показатели и фертильность мужчин с муковисцидозом.

Хотя нами не выявлено зависимости сперматологических показателей от возраста (возможно, из-за малочисленности выборки), влияние возраста на состояние семенных пузырьков и их функционирование у пациентов с муковисцидозом было показано ранее. Так, атрофию семенных пузырьков не отмечают у мальчиков с муковисцидозом, но она встречается у 80–85 % взрослых мужчин с этим заболеванием [4]. Ввиду возможности прогрессирования сперматологических нарушений, обструкции семявыносящих путей, а также тяжести самого заболевания мужчинам с муковисцидозом без азооспермии рекомендуется криоконсервация сперматозоидов для дальнейшего их использования в программах экстракорпорального оплодотворения [26].

Выводы данного исследования ограничены ввиду небольшого размера выборки пациентов (в связи с тем, что практически все пациенты с муковисцидозом имеют азооспермию), а также ввиду того, что спермиологическое исследование проводилось однократно из-за отсутствия возможности или нежелания проходить повторное обследование. Кроме того, по этой же причине не в полном объеме осуществлены некоторые

инструментальные исследования; отсутствует контроль состояния пациентов в динамике.

Заключение

У мужчин с легочной формой муковисцидоза, имеющих мутацию 3849+10kbC>T гена *CFTR*, проходимость семявыносящих путей может быть сохранена, поэтому их фертильность может быть не нарушена. Сперматологические диагнозы варьируют от нормозооспермии до олиго-, астено- и тератозооспермии, при этом не выявлено специфических форм атипичии сперматозоидов и ультраструктурных морфологических нарушений. Олигоспермия и сниженное количество фруктозы в эякуляте косвенно свидетельствуют о поражении семенных пузырьков у некоторых пациентов с муковисцидозом, у которых сохранена проходимость семявыносящих путей. Обнаруженные сперматологические изменения следует учитывать при оценке фертильности пациентов с муковисцидозом, планировании деторождения, решении их репродуктивных проблем, андрологическом обследовании и лечении.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Муковисцидоз. Под ред. Н.И. Капранова, Н.Ю. Каширской. М.: Медпрактика-М, 2014. [Cystic fibrosis. Ed. by N.I. Kapranov, N.Yu. Kashirskaya. Moscow: Medpraktika-M, 2014. (In Russ.)].
2. Chen M., Du J., Jiang W. et al. Functional expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat oviduct epithelium. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40(10):864–72. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2008.00469.x.
3. Штаут М.И., Шилейко Л.В., Репина С.А. и др. Комплексное сперматологическое обследование пациентов с муковисцидозом. *Андрология и генитальная хирургия* 2017;18(4):69–76. [Shtaut M.I., Schileiko L.V., Repina S.A. et al. Comprehensive semen examination in patients with cystic fibrosis. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2017;18(4):69–76. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2070-9781-2017-18-4-69-76.
4. Репина С.А., Красовский С.А., Роживанов Р.В. и др. Андрологическое обследование пациентов с легочной и смешанной формами муковисцидоза. *Андрология и генитальная хирургия* 2018;19(2):31–9. [Repina S.A., Krasovskiy S.A., Rozhivanov R.V. et al. Andrology examination of patients with pancreatic-sufficient and pancreatic-insufficient cystic fibrosis. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2018;19(2):31–9. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2070-9781-2018-19-2-31-39.
5. Штаут М.И., Сорокина Т.М., Курило Л.Ф. и др. Сравнительный анализ результатов спермиологического исследования у пациентов с азооспермией, вызванной муковисцидозом и синдромом врожденной двусторонней аплазии семявыносящих протоков. *Андрология и генитальная хирургия* 2019;20(1):82–90. [Shtaut M.I., Sorokina T.M., Kurilo L.F. et al. Comparative analysis of the results semen examination in patients with azoospermia caused by cystic fibrosis and congenital bilateral aplasia of vas deferens syndrome. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2019;20(1):82–90. (In Russ.)].
6. Taussig L.M., Lobeck C.C., di Sant'Agnese P.A. et al. Fertility in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1972;287(12):586–9. DOI: 10.1056/NEJM197209212871204.
7. De Braekeleer M., Férec C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod* 1996;2(9):669–77. DOI: 10.1093/molehr/2.9.669.
8. Репина С.А., Красовский С.А., Сорокина Т.М. и др. Патогенный вариант 3849+10kbC>T гена *CFTR* как главный предиктор сохранения фертильности у мужчин с муковисцидозом. *Генетика* 2019;55(12):1481–6. [Repina S.A., Krasovskiy S.A., Sorokina T.M. et al. *CFTR* gene pathogenic variant 3849+10kbC>T as a major predictor of preserved fertility in male patients with cystic fibrosis. *Genetika = Genetics* 2019;55(12):1481–6. (In Russ.)].
9. Репина С.А., Красовский С.А., Шмарина Г.В. и др. Состояние репродуктивной системы и алгоритм решения вопроса деторождения у мужчин с муковисцидозом. *Альманах клинической медицины* 2019;47(1):26–37. [Repina S.A., Krasovskiy S.A., Shmarina G.V. et al. Reproductive system status and the algorithm to solve fertility issues in men with cystic fibrosis. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine* 2019;47(1):26–37. (In Russ.)].
10. Черных В.Б. Ген муковисцидоза и нарушение фертильности у мужчин. *Андрология и генитальная хирургия* 2010;11(4):23–31. [Chernykh V.B. *CFTR* gene and male infertility. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology*

- and Genital Surgery 2010;11(4):23–31. (In Russ.).
11. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. 5-е изд. Пер. с англ. Н.П. Макарова, научн. ред. Л.Ф. Курило. М.: Капитал Принт, 2012. 291 с. [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edn. Transl. from English by N.P. Makarov, ed. by L.F. Kurilo. Moscow: Kapital Print, 2012. 291 p. (In Russ.).]
 12. Патент на изобретение № 2328736/10.07.2008. Бюл. № 19. Курило Л.Ф. Способ цитологической диагностики нарушения сперматогенеза. Доступно по: https://yandex.ru/patents/doc/RU2328736C1_20080710. [Patent RU № 2328736/10.07.2008. Bull. № 19. Kurilo L.F. Method of cytogenetic diagnosis of spermatogenesis violation. Available at: https://yandex.ru/patents/doc/RU2328736C1_20080710. (In Russ.).]
 13. Андреева М.В., Хаят С.Ш., Шилейко Л.В. и др. Количественный кариологический анализ незрелых половых клеток из эякулята как часть протокола обследования мужчин с бесплодием в браке. Андрология и генитальная хирургия 2017;18(1):62–9. [Andreeva M.V., Khayat S.Sh., Schileiko L.V. et al. Quantitative karyological analysis of immature germ cells from ejaculate as part of examination of patients with infertility in marriage. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2017;18(1):62–9. (In Russ.).]
 14. Брагина Е.Е., Бочарова Е.Н. Количественное электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов при диагностике мужского бесплодия. Андрология и генитальная хирургия 2014;15(1):41–50. [Bragina Ye.Ye., Bocharova Ye.N. Quantitative electron microscopic examination of sperm for male infertility diagnosis. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2014;15(1):41–50. (In Russ.).]
 15. Брагина Е.Е., Арифалин 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., Arifulin 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.
 16. Брагина Е.Е., Арифалин Е.А., Хафизова П.О., Харчилава Р.Р. Структуры хроматина сперматозоидов человека и фрагментация ДНК в норме и при нарушениях фертильности. *Врач* 2013; (2):81–5. [Bragina E.E., Arifulin E.A., Khafizova P.O., Kharchilava R.R. Human sperm chromatin structures and DNA fragmentation in health and infertility. *Vrach = The Doctor* 2013;(2):81–5. (In Russ.).]
 17. Cooper T.G., Weidner W., Nieschlag E. The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers alphaglucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *Int J Androl* 1990;13(5):329–36. DOI: 10.1111/j.1365-2605.1990.tb01040.x.
 18. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. Под ред. Т.Э. Ивашенко, В.С. Баранова. СПб.: Интермедика, 2002. [Biochemical and molecular-genetic bases of cystic fibrosis pathogenesis. Ed. by T.E. Ivashchenko, V.S. Baranov. Saint Petersburg: Intermedika, 2002. (In Russ.).]
 19. Yuan P., Liang Z.K., Liang H. et al. Expanding the phenotypic and genetic spectrum of Chinese patients with congenital absence of vas deferens bearing CFTR and ADGRG2 alleles. *Andrology* 2019;7(3):329–40. DOI: 10.1111/andr.12592.
 20. Gottlieb C., Plöen L., Kvist U., Strandvik B. The fertility potential of male cystic fibrosis patients. *Int J Androl* 1991;14(6):437–40. DOI: 10.1111/j.1365-2605.1991.tb01272.x.
 21. Kaplan E., Shwachman H., Perlmutter A.D. et al. Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1968;279(2):65–9. DOI: 10.1056/NEJM196807112790203.
 22. Xu W.M., Chen J., Chen H. et al. Defective CFTR-dependent CREB activation results in impaired spermatogenesis and azoospermia. *PLoS One* 2011;6(5):e19120. DOI: 10.1371/journal.pone.0019120.
 23. De Braekeleer M., Férec C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod* 1996;2(9):669–77. DOI: 10.1093/molehr/2.9.669.
 24. Tizzano E.F., Silver M.M., Chitayat D. et al. Differential cellular expression of cystic fibrosis transmembrane regulator in human reproductive tissues. Clues for the infertility in patients with cystic fibrosis. *Am J Pathol* 1994;144(5):906–14.
 25. Viville S., Wärter S., Meyer J.M. et al. Histological and genetic analysis and risk assessment for chromosomal aberration after ICSI for patients presenting with CBAVD. *Hum Reprod* 2000;15(7):1613–8.
 26. Thorpe-Beeston J.G. Contraception and pregnancy in cystic fibrosis. *J R Soc Med* 2009;102 Suppl 1:3–10. DOI: 10.1258/jrsm.2009.s19002.

Вклад авторов

А.О. Седова: анализ данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;
М.И. Штаут: проведение спермиологического исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи;
Е.Е. Брагина: проведение электронной микроскопии сперматозоидов, исследование методом флуоресцентного мечения одно- и двунитевых разрывов ДНК;
С.Е. Репина: клиническое обследование пациентов, получение данных для анализа;
Т.М. Сорокина: клиническое обследование пациентов;
Л.Ф. Курило: разработка методов спермиологического исследования (количественного кариологического анализа незрелых половых клеток), научное редактирование текста рукописи;
В.Б. Черных: разработка дизайна исследования, клиническое обследование пациентов, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание и редактирование текста статьи.

Authors' contributions

A.O. Sedova: analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing;
M.I. Shtaut: spermological examination, analysis of the obtained data, article writing;
E.E. Bragina: transmission electronic microscopy of spermatozoa, TUNEL assay;
S.E. Repina: clinical examination of infertile male patients, obtaining data for analysis;
T.M. Sorokina: clinical examination of infertile male patients;
L.F. Kurilo: developing the quantitative karyological analysis of immature germ cells method, scientific editing of the article;
V.B. Chernykh: developing the research design, clinical examination of patients, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing, scientific editing of the article.



ORCID авторов / ORCID of authors

А.О. Седова / A.O. Sedova: <https://orcid.org/0000-0002-7032-0793>

М.И. Штаут / M.I. Shtaut: <https://orcid.org/0000-0002-0580-5575>

С.А. Репина / S.E. Repina: <https://orcid.org/0000-0001-5244-3901>

Е.Е. Брагина / E.E. Bragina: <https://orcid.org/0000-0002-8422-4962>

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 Министерства образования и науки России.

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

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Медико-генетического научного центра им. акад. Н.П. Бочкова (протокол № 4/3 от 15.10.2018). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics (protocol No. 4/3 from 15.10.2018). All patients gave written informed consent to participate in the study.