

ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ИНДЕКСА ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ВАРИКОЦЕЛЕ

*Поздняков О. Б.¹, Елисеева Т. И.,² Артамонов А. А.³, Боголюбов С. В.³,
Елисеева И. В.⁴, Голубенкова О. В.¹, Ситкин С. И.¹

¹Кафедра анестезиологии, реаниматологии и интенсивной терапии

²Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии

³Кафедра госпитальной хирургии с курсом урологии, ⁴Кафедра акушерства и гинекологии
Тверской государственной медицинской университет, Тверь, Россия

*Corresponding author: sptnrx@gmail.com

Abstract

DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL CHANGES SPERM DNA FRAGMENTATION INDEX IN PATIENTS WITH VARICOCELE

Background: To date remains an urgent problem of apoptosis, and the dynamics of change of the index fragmentation of deoxyribonucleic acid (DNA) in spermatozoa in patients with varicocele.

Material and methods: The study included two groups: osnovnaya- patients with varicocele (n = 35) and control and healthy donors (n = 32). The average age of patients in both groups was $30 \pm 4,5$ years. Studying the degree of DNA fragmentation in the sperm was conducted by the method of vital staining of cells with acridine orange (AO). It takes into account the percentage of the number of sperm with green fluorescence of intact sperm chromatin to yellow, orange and red fluorescence fragmented chromatin. 200 spermatozoa were counted in different fields of view of the microscope and calculate the percentage of cells with green and red glow of chromatin. For reversible inhibition of DNA breaks in the sperm were incubated in a refrigerator at 4°C for 24 hours. Accounting chromatin fragmentation was also carried out after staining sperm acridine orange method described above and subsequent microscopy preparation on fluorescence microscope.

Results: Patients of the main group affected by varicocele by incubation for 1 hour DNA fragmentation index in the color AO was $19,0 \pm 3,0\%$. Later, after 24 hours of incubation sperm to study at a $+4^{\circ}\text{C}$ figure dropped to $10,1 \pm 2,0\%$ ($p < 0.05$). In the control group of healthy donors hour incubation of sperm DNA fragmentation index was $2,0 \pm 0,5\%$. After a 24 hour incubation in the cold in this group the rate was $1,5 \pm 0,5\%$ ($p > 0.05$).

Conclusions: Thus, this technique sperm incubation at $+4^{\circ}\text{C}$ can be used to determine sperm count with complete and irreversible double-longitudinal break DNA molecules occurs during the late stages of apoptosis.

Key word: DNA fragmentation of sperm, varicocele, apoptosis, male infertility.

Актуальность

Бесплодие (клиническое определение) – болезнь репродуктивной системы, которая выражается в отсутствии клинической беременности после 12-ти или более месяцев регулярной половой жизни без предохранения от беременности.

Известно, что от 10 до 25% семейных пар не имеют детей. Среди причин отсутствия детей в семье мужской фактор составляет от 40 до 60% [1, 2].

В настоящее время все чаще, кроме стандартных тестов исследования эякулята рекомендованных ВОЗ, используются дополнительные тесты по оценке качества сперматозоидов. Большое внимание уделяется изучению хроматина сперматозоидов и факторов, влияющих на его структуру.

Известно, что созревание сперматозоидов сопряжено с изменением многих структур и функций сперматозоидов: плазматических мембран, протоплазмы и, главное, ядерного материала. Хроматин ядра в процессе созревания, которое происходит в придатке яичка, конденсируется и уплотняется при формировании дисульфидных связей (-S-S-) между сопредельными белковыми молекулами хроматина вследствие окисления сульфгидридных групп (-SH) серосодержащих аминокислот. В свою очередь соотношение количества -SH групп, окисленных до -S-S- связей, обусловлено временем продвижения сперматозоидов по каналу эпидидимиса и условиями среды, в которых при этом находятся сперматозоиды [3].

До настоящего времени остается актуальной проблема апоптоза и динамики изменений индекса фрагментации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в сперматозоидах у пациентов с

варикоцеле. Данный процесс возникает в результате индуцирования активности эндонуклеаз и каспаз в клетках. Процесс активации этих ферментов индуцирует много причин, в том числе фактор некроза опухоли, продукты перекисного окисления липидов, интерлейкины, отсутствие фактора роста, глюкокортикоидные гормоны и др. через CD-95+ рецептор. Эти факторы опосредуют открытие каналов для ионизированного кальция и инициируют вход данных катионов внутрь клетки. Каспазы образуясь из предшественников каспаз, являются цистеинсодержащими протеазами. Их функция проявляется после проникновения внутрь ядра из цитоплазмы клеток. Каспазы способны активировать эндонуклеазы ядра, что способствует протеолизу ламин которые поддерживают хроматин в упорядоченном состоянии.

В связи с этим деструкция нити ДНК в ядрах клеток в начале носит обратимый характер, который в дальнейшем завершается апоптозом клетки [4, 5].

Одновременно существуют системы блокады механизмов апоптоза. К ним относят интерлейкин 1, интерлейкин 2, гамма интерферон и др. Данные вещества снижают экспрессию CD-95 рецептора на поверхности клеточной мембраны. В результате чего индукторы апоптоза теряют свою точку воздействия на клетку.

Также существует семейство Bcl-2 белков локализующихся в мембранах митохондрий, околоядерной мембране, гладком цитоплазматическом ретикулуме. Белок Bcl-2 блокирует высвобождение из митохондрий цитохрома C, который инициирует активность внутриклеточных каспаз. Морфологически апоптоз клетки проявляется конденсацией хроматина с формированием диффузных гомогенных образований потерявших сетчатую структуру хроматина. Стенки клетки спадаются и она превращается в апоптотическое тельце. Причем фосфолипиды клеточной мембраны на завершающих этапах апоптоза содержат большое количество фосфодиэтилсерина, который способствует последующему фагоцитозу апоптотического тельца макрофагами [6]. Апоптоз у пациентов с варикоцеле может возникать как на ранних стадиях сперматогенеза, так и в зрелых сперматозоидах.

Методом изучения характера разрывов молекул ДНК при апоптозе, является витальная окраска флуоресцентным красителем акридиновым оранжевым (АО). Данный краситель способен флуоресцировать при взаимодействии с нуклеиновыми кислотами в различных спектрах длины световой волны. Двухцепочечная структура ДНК интенсивно флуоресцирует с АО в зеленом спектре светового излучения. Одноцепочечная молекула рибонуклеиновой кислоты (РНК) сорбируя молекулу АО дает свечение с большей длиной световой волны красного цвета. Одновременно при окраске цитоплазмы, особенно в соматических клетках, богатых РНК, последняя окрашивается в красный цвет [7].

Целью данного исследования явилось изучение изменения интенсивности фрагментации и характер разрывов ДНК в сперматозоидах при окраске АО, до и после инкубацией спермы при +4 °С в течении 24 часов.

Материал и методы

В исследование включено две группы: основная и контрольная. В основной группе изучалась интенсивность процессов фрагментации ДНК в сперматозоидах у пациентов с варикоцеле. Данную группу составили 35 пациентов. Диагноз варикоцеле устанавливался на основании клинической картины и УЗИ признаках (дилатация семенной вены > 3 мм при выполнении пробы Вальсальвы, рефлюкс > 1 сек). Группа сравнения состояла из 32 здоровых доноров. Средний возраст пациентов обеих групп составил 30 ± 4,5 года. Образцы эякулята были получены путем мастурбации после 48-72 часов воздержания.

Изучение степени фрагментации ДНК в сперматозоидах проводилась по методике витальной окраски клеток акридиновым оранжевым на забуференном физиологическом растворе. Для этого использовался основной раствор АО приготовленный путем растворения 100 мг красителя в 100 мл дистиллированной воды. Рабочий раствор АО готовился *ex tempore* путем разведения 20 мкл основного раствора в 1000 мкл забуференного фосфатами физиологического рас-

творы NaCl с рН 7,2. Сперму инкубировали в течении 1 часа при 37°C в термостате до разжижения спермиоплазмы. В дальнейшем 10 мкл спермы смешивалось с 10 мкл рабочего раствора акридинового оранжевого на предметном стекле и микропрепарат накрывался покровным стеклом. Проводилась микроскопия данного препарата в флуоресцентном микроскопе МФС-3. Возбуждение флуоресценции АО проводилось при длине волны 455 нм. Запирающий светофильтр препятствовал проникновению синего спектра светового излучения в окуляр микроскопа. Учитывалось процентное соотношение количества сперматозоидов с зеленой флуоресценцией неповрежденного хроматина к сперматозоидам с желтой, оранжевой и красной флуоресценцией фрагментированного хроматина. Просчитывалось 200 сперматозоидов в различных полях зрения микроскопа и высчитывалось процентное соотношение клеток с зеленым и красным свечением хроматина.

Для ингибирования обратимых разрывов в ДНК сперму инкубировали в холодильнике при +4°C в течении 24 часов. Учет фрагментации хроматина проводили также после окраски сперматозоидов акридиновым оранжевым вышеописанным методом и последующей микроскопией препарата с помощью флуоресцентного микроскопа [8, 9].

Данные полученные в результате исследования, были обработаны с использованием стандартных статистических программ Excel-2007, SPSS. Сравнение двух независимых групп по количественным признакам осуществлялось непараметрическим методом с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У пациентов основной группы страдающих варикоцеле при инкубации в течении 1 часа индекс фрагментации ДНК при окраске АО составил $19,0 \pm 3,0\%$. В дальнейшем после 24 часовой инкубации спермы при +4 °С исследуемый показатель снизился до $10,1 \pm 2,0\%$ ($p < 0,05$). Дальнейшая инкубация спермы на холоде не приводит к снижению фрагментации хроматина у пациентов с варикоцеле. В группе сравнения у здоровых доноров через час инкубации спермы индекс фрагментации ДНК составил $2,0 \pm 0,5\%$. После 24 часовой инкубации на холоде в этой группе данный показатель составлял $1,5 \pm 0,5\%$ ($p > 0,05$) (таблица 1).

Таблица 1

Показатели фрагментации ДНК сперматозоидов у пациентов с варикоцеле при инкубации +4°C в течении 24 часов

	Инкубация в течение 1 час при +37 С	Инкубация в течение 24 часов при + 4С	Р
Пациенты с варикоцеле	$19,0 \pm 3,0 \%$	$10,1 \pm 2,0 \%$	$< 0,05$
Здоровые доноры	$2,0 \pm 0,5 \%$	$2,0 \pm 0,5 \%$	$> 0,05$

Процессы фрагментации ДНК сперматозоидов происходят интенсивнее у пациентов с варикоцеле. Это обусловлено рядом причин связанных с тепловым стрессом, венозным застоем, гипоксией и ишемией в тестикулярной ткани, которые приводят к повышению в клетках активных форм кислорода [10].

Кроме того нельзя исключить факт, что нарушения гемодинамики при варикоцеле может захватывать область кровоснабжения дополнительных половых желез, оказывая тем самым отрицательное влияние на их секреторную функцию [11].

Разрывы ДНК в хромосомах сперматозоидов носят продольный характер, соответствующий расхождению двухцепочечной структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты в две одноцепочечные. Это способствует сорбции АО на фосфатных группах в местах продольных разрывов нуклеотида, изменению конформации молекулы красителя АО, что дает длинноволновой сдвиг спектра флуоресценции последнего в красную область. При микроскопии флуоресценция голо-

вок сперматозоидов изменяется с зеленого (флуоресценция интактной двухцепочечной ДНК) на желтый, оранжевый, красный и ярко красный цвета. В процессе инкубации сперматозоидов при +4 °С в течении суток часть продольных разрывов двухспиральной молекулы ДНК снизилось у пациентов с варикоцеле на 52,6%. Подобные изменения свидетельствуют о обратимом характере части разрывов и репарации молекулы ДНК. Однако 47,4% головок сперматозоидов сохранили желто-оранжево-красную флуоресценцию, что свидетельствует о необратимом процессе фрагментации ДНК. Причем такой характер разрывов преобладал у пациентов с варикоцеле и был минимален в группе здоровых доноров.

Выводы

Таким образом, данную методику инкубации сперматозоидов при +4°С можно использовать для определения количества сперматозоидов с полным и необратимым продольным разрывом двухспиральной молекулы ДНК возникающей в процессе последних стадий апоптоза. Следует отметить, что подсчет числа сперматозоидов окрашенных АО сразу после инкубации спермы в термостате при +37 °С выявляет их как обратимый, так и необратимый характер разрывов ДНК, что имеет завышенный характер. Повышенный индекс необратимой фрагментации ДНК у пациентов с варикоцеле, свидетельствует о снижении фертильности спермы и требует как медикаментозных, так и хирургических методов коррекции данной патологии.

Литература

1. Фундаментальные основы сосудистой андрологии/ А.А. Артюхин.- М.: издательский центр «Академия», 2008.- 224 с.
2. Практическая андрология / С.Ю. Калинин, И.А.Тюзиков.- М.: Практическая медицина, 2009- 339с.
3. Багиров В.А. и др. Фертильность сперматозоидов и состояние хроматина: методы контроля (обзор). Сельскохозяйственная биология 2012, №2 ; 3-13.
4. Осадчук Л.В, Еркович А.А., Татару Д.А, и др. Уровень фрагментации ДНК в сперматозоидах человека при варикоцеле и простатите. Урология. 2014; 3: 37-43.
5. Шейна Ю.И., Зайцева Т.А., Махалова Н.А., и др. Анализ фрагментации ДНК в сперматозоидах с помощью окраски акридиновым оранжевым у пациентов с бесплодием. Проблемы репродукции. 2012; 5: 74-76.
6. Князькин И.В., Цыган В.Н. Апоптоз в онкоурологии.-СПб.:Наука,2007.-240 с.
7. Беляева Т.Н., Кроленко С.А., Леонтьева Е.А. и др. Распределение и спектры флуоресценции АО в миобластах и одиночных мышечных волокнах. Цитология. 2009; том 51, №2; 103-110.
8. Маркова Е.В., Замай А.С. Фрагментация ДНК в сперматозоидах человека (обзор литературы). Проблемы репродукции 2006; 4: 42-50.
9. Кост Е.А. Справочник по клиническим методам исследования. Москва 1968; 435.
10. Marmar JL. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. Hum Reprod Update. 2001 Sep-Oct;7(5):461-72.
11. Пугачев А.Г. и др. Варикоцеле у подростков: проблема мужской фертильности. Экспериментальная и клиническая урология 2010 №3; 43-46.