

УДК 618.36:618.4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА У МУЖЧИН С НОРМО- И ОЛИГОАСТЕНОЗОСПЕРМИЕЙ

^{1,2}Шурыгина О.В., ¹Беляева Л.А., ¹Русаков Д.Ю., ³Юхимец С.Н.,
¹Ратенкова Н.В., ¹Попова О.В.

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара

²ЗАО «Медицинская компания ИДК», Самара

³Частное учреждение образовательная организация высшего образования

«Медицинский университет «Реавиз», Самара

Резюме. Мужская репродуктивная система является одной из наиболее чувствительных в организме и подвергается воздействию целого ряда неблагоприятных факторов, которые, влияя на эндокринные железы, центральную нервную систему и непосредственно на гонады, вызывают дистрофические изменения в семенных канальцах и интерстициальной ткани яичек. В 7–8 % случаев причиной бесплодия являются нарушения качества спермы. Одним из факторов, снижающих мужскую фертильность, считается гиперпродукция активных форм кислорода.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Ключевые слова: мужское бесплодие, оксидативный стресс, нормозооспермия, олигоастенозооспермия.

Для цитирования: Шурыгина О.В., Беляева Л.А., Русаков Д.Ю., Юхимец С.Н., Ратенкова Н.В., Попова О.В. Определение оксидативного стресса у мужчин с нормо- и олигоастенозооспермией // Вестник медицинского института «Реавиз». – 2020. – № 5. – С. 84–90. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2020.5.9>

ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS IN MEN WITH NORMOZOOSPERMIA AND OLIGOASTHENOZOOSPERMIA

^{1,2}Shurygina O.V., ¹Belyaeva L.A., ¹Rusakov D.Yu., ³Yukhimets S.N.,
¹Ratenkova N.V., ¹Popova O.V.

¹Federal State Budgetary Institution of Higher Education 'Samara State Medical University,' Ministry of Health of the Russian Federation, Samara

²Medical Company IDK, Samara

³Private Institution of Higher Education 'Medical University 'Reaviz,' Samara

Abstract. The male reproductive system is one of the most vulnerable systems in the body and is exposed to many negative factors that affect the endocrine glands, central nervous system, and gonads, thereby causing dystrophic changes in the seminiferous tubules and testicular interstitial tissue. In 7–8% of cases, infertility is caused by low semen quality. Hyperproduction of reactive oxygen species is believed to be one of the factors reducing male fertility.

Competing interests. The authors declare no competing interests.

Funding. This research received no external funding.



Key words: male infertility, oxidative stress, normozoospermia, oligoasthenozoospermia

Cite as: Shurygina O.V., Belyaeva L.A., Rusakov D.Yu., Yukhimets S.N., Ratenkova N.V., Popova O.V. Assessment of oxidative stress in men with normozoospermia and oligoasthenozoospermia // Bulletin of Medical University Reaviz. – 2020. – № 5. – P. 84–90. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2020.5.9>

Мужское бесплодие – нарушение мужской репродуктивной функции, выражающееся в невозможности иметь потомство. В настоящее время в 40–50 % случаев именно мужской фактор служит причиной бесплодного брака. Наиболее частыми причинами мужского бесплодия являются:

1. Невозможность выхода сперматозоидов из органов репродуктивной системы.
2. Снижение количества и качества сперматозоидов.
3. Повреждение генетического материала сперматозоида (фрагментация ДНК).

Одним из факторов, снижающих мужскую фертильность, считается гиперпродукция активных форм кислорода (АФК) или оксидативный стресс. В эякуляте источниками образования АФК являются как сами сперматозоиды (при неправильной дифференциации клеток во время сперматогенеза), так и лейкоциты. В небольших количествах АФК необходимы для нормальной регуляции функции сперматозоидов, их гиперактивации и акросомальной реакции. Но избыточная продукция АФК приводит к повреждению мембраны сперматозоидов, снижению их подвижности и нарушению оплодотворяющей способности. Кроме того, АФК непосредственно повреждают ДНК хромосом и инициируют опосредованный эндонуклеазами апоптоз сперматозоидов, что приводит, в конечном счете, к бесплодию. Среди причин, приводящих к повышению продукции АФК, выделяют возраст, образ жизни (курение, избыточная масса тела, нехватка витаминов-антиоксидантов и др.), воспаление, варикоцеле, диабет. Возможно, существует корреляция между уровнем окислительного стресса сперматозоидов и мужским бесплодием.

Функциональные тесты, определяющие цитофизиологические особенности спер-

мы, являются необходимым дополнением к традиционному анализу эякулята в андрологической практике в настоящее время.

Ряд лабораторных тестов оценивают возможность сперматозоида выполнять ключевые функции, необходимые для оплодотворения:

1. Эффективность прохождения через цервикальную слизь.
2. Способность к капацитации и гиперактивации.
3. Способность противостоять осмотическому стрессу.
4. Измерение активных форм кислорода и фрагментации.
5. Способность к акросомальной реакции.
6. Другие.

Согласно Рекомендациям Всемирной Организации Здравоохранения (WHO-2010), Европейской ассоциации репродукции человека и эмбриологии (ESHRE-2016) и Европейской урологической ассоциации (EAU-2017) определение уровня активных форм кислорода входит в перечень рекомендуемых методов обследования при мужском бесплодии и нарушениях развития беременности.

Патофизиология оксидативного стресса заключается в следующем: сперматозоиды осуществляют интенсивные движения при помощи хвоста, а также должны обладать способностью пенетрировать ооциты. Эти процессы требуют высокого уровня окислительного метаболизма. В результате продуцируются активные формы кислорода – одноатомные молекулы, называемые свободными радикалами. Повышенное содержание АФК является признаком оксидативного стресса. Образование свободных радикалов приводит к нарушению функции сперматозоидов: гиперпродукция АФК вызывает модификацию ядерной ДНК, раз-

рушает липиды и белки плазматической митохондриальной мембраны. Нарушение структуры плазматической мембраны изменяет ее текучесть, что ухудшает подвижность сперматозоида и изменяет акросомальную реакцию, необходимую для пентрации сперматозоидом оболочки яйцеклетки.

При оксидативном стрессе происходит нарушение баланса свободных радикалов кислорода в сперме. Обычно их вырабатывается небольшое количество, которое необходимо для функционирования половых клеток. Но если свободных радикалов больше нормы, то их необходимо нейтрализовать и удалить.

Примерно 80 % всех причин мужского бесплодия связаны с оксидативным стрессом, который влияет на процент фрагментации ДНК. На сегодняшний день актуальной считается роль мужского фактора в невынашивании женщиной беременности. Доказано, что в большинстве случаев самопроизвольное прерывание беременности на ранних сроках обусловлено повреждающим действием оксидативного стресса на сперматозоиды.

Несмотря на успехи вспомогательных репродуктивных технологий, потери на ранних сроках развития эмбриона весьма высоки. Остановка эмбрионов на третьи – пятые сутки их развития может быть обусловлено влиянием мужского фактора бесплодия. Одной из причин развития такой ситуации – отсутствие подготовки мужчин к

процедуре вспомогательных репродуктивных технологий.

Часто спермальный оксидативный стресс связан с системными гормонально-метаболическими нарушениями, которые редко диагностируются и корректируются в ежедневной урологической практике. К этим причинам можно отнести все случаи патоспермии у молодых мужчин с ожирением, инсулинорезистентностью и другими компонентами метаболического синдрома, которые могут индуцировать системный и спермальный окислительный стресс. Ключевая роль в поддержании баланса и повышении мужской фертильности принадлежит антиоксидантам – флавоноидам, каротиноидам, витаминам С и Е, L-цитруллину и ацетил-L-карнитину.

Таким образом, учитывая влияние оксидативного стресса на качество спермы и результаты программ ВРТ, на базе ЗАО «Медицинская компания ИДК», группой компании «Мать и дитя» выполнено клинко-лабораторное исследование, целью которого явилось определение уровня окислительного стресса у мужчин с нормо- и олигоастенозооспермией.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Определить группы мужчин с нормо- и олигоастенозооспермией.
2. Определить уровень АФК в эякуляте среди мужчин с нормозооспермией.
3. Определить уровень АФК в эякуляте среди мужчин с олигоастенозооспермией.

Таблица 1. Требования ВОЗ по исследованию и обработке эякулята [8]

Показатель	Минимальное референсное значение
Объем эякулята, мл	1,5 (1,4–1,7)
Общее количество сперматозоидов в эякуляте, 10^6 на эякулят	39 (33–46)
Концентрация сперматозоидов, 10^6 на мл	15 (12–16)
Общая подвижность, %	40 (38–42)
Прогрессивно подвижные, %	32 (31–34)
Жизнеспособность (живые сперматозоиды), %	58 (55–63)
Морфология сперматозоидов, нормальные формы, %	4 (3,0–4,0)

Определение концентрации и оценку подвижности сперматозоидов проводили в камере Маклера путем подсчета сначала всех сперматозоидов в 10 малых квадратах (общая концентрация), далее – только прогрессивно подвижных в 10 малых квадратах.

Обработка эякулята проводилась в ламинарном шкафу II класса защиты. Для подсчета сперматозоидов использовался микроскоп *Olympus CX-41RF* с увеличением в 400 раз.

Определение уровня окислительного стресса проводили с помощью диагностического набора *OxiSperm (Halotech, Madrid – Spain)*.

В состав реакционного геля из диагностического набора *OxiSperm* входит нитросиний тетразолий. Его химическое свойство заключается в способности водорастворимой соли тетразолия превращаться под действием супероксидных радикалов в нерастворимые в воде синие кристаллы, известные как формазан. В эякуляте эти кристаллы прикрепляются к мембранам сперматозоидов, что позволяет легко их визуализировать в светлом поле микроскопа. Такие кристаллы обладают интенсивной окраской в реакционном геле (от почти прозрачного до темно-синего), что можно легко оценить невооруженным глазом, используя цветовую шкалу.

Статистическую обработку опытных данных проводили с использованием критерия Стьюдента. Контрольную группу составили лица, являющиеся донорами спермы.

Результаты определения общей концентрации и концентрации прогрессивно подвижных сперматозоидов представлены в табл. 2.

В исследовании приняло участие 20 добровольцев, из которых у 10 лиц выявлена нормозооспермия, общая концентрация сперматозоидов составила $91,13 \pm 8,29$ млн на мл, концентрация прогрессивно подвижных – $35,38 \pm 3,71$ млн на мл, и 10 лиц с олигоастенозооспермией, общая концентрация у которых составила $12,13 \pm 1,08$ млн на мл, концентрация прогрессивно подвижных – $2,25 \pm 0,42$ млн на мл.

Таким образом, из 20 лиц, обратившихся в клинику по поводу бесплодия, у 50 % была выявлена нормозооспермия, т.е. потенциально мужской фактор бесплодия данной пары не был подтвержден.

После распределения мужчин на группы с нормо- и олигоастенозооспермией был проведен анализ по определению уровня оксидативного стресса в этих группах.

Результаты показали, что уровень оксидативного стресса у лиц контрольной группы (доноры спермы) характеризовался как очень низкий в 80 % случаев и как низкий – в 20 % случаев, согласно цветовой шкале метода *OxiSperm* (рис. 1).

Уровень оксидативного стресса в группе пациентов с нормозооспермией характеризовался как очень низкий в 60 % случаев, низкий – в 20% случаев и средний – в 20 % случаев (рис. 2).

Таблица 2. Общая концентрация и концентрация прогрессивно подвижных сперматозоидов в исследуемых группах мужчин

Группа	Общая концентрация сперматозоидов	Концентрация прогрессивно подвижных сперматозоидов
Контроль	$106,88 \pm 10,76$	$49,00 \pm 3,50$
Пациенты с нормозооспермией	$91,13 \pm 8,29$	$35,38 \pm 3,71^*$
Пациенты с олигоастенозооспермией	$12,13 \pm 1,08^{**}$	$2,25 \pm 0,42^{**}$

Примечание: * – достоверные различия при $p < 0,05$ по отношению к контролю; ** – достоверные различия при $p < 0,001$ по отношению к контролю.

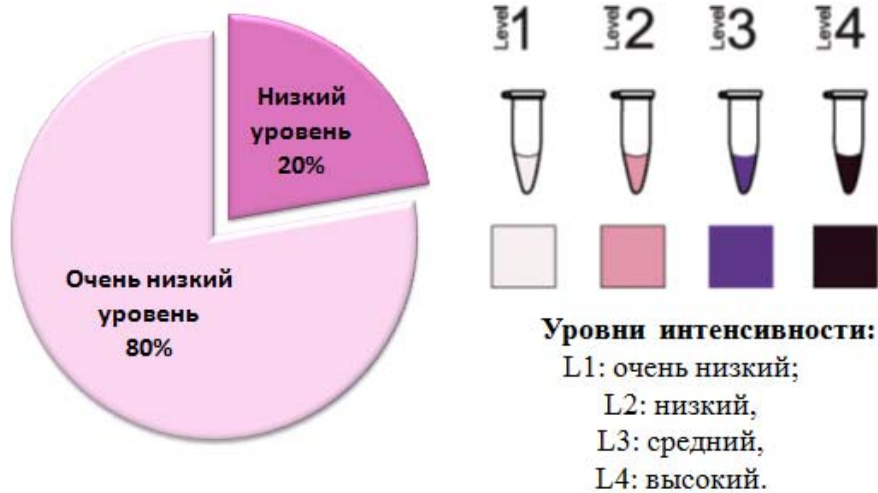


Рис. 1. Уровень оксидативного стресса в контрольной группе

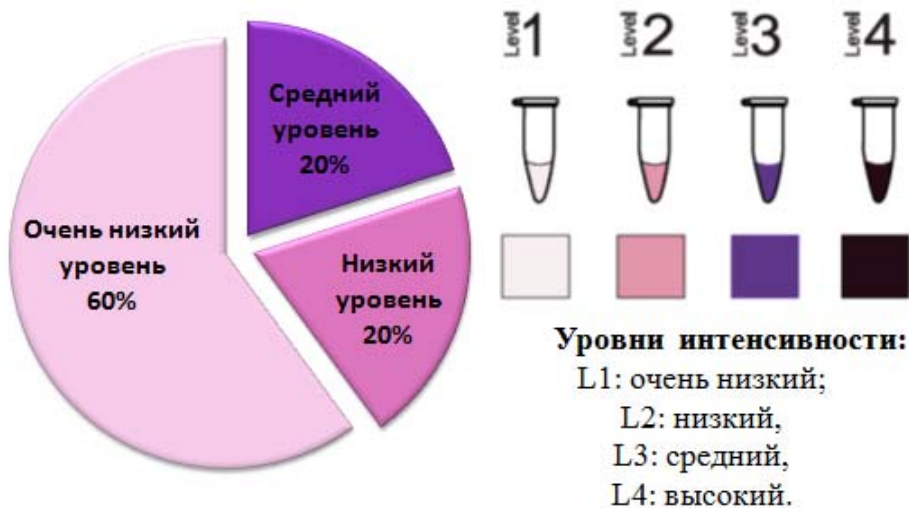


Рис. 2. Уровень оксидативного стресса в группе пациентов с нормозооспермией

Уровень оксидативного стресса в группе пациентов с олигоастенозооспермией характеризовался как средний в 20 % случаев и как высокий – в 80 % случаев (рис. 3).

Таким образом, с помощью метода *OxiSperm* в условиях андрологической лаборатории можно визуально оценить уровень оксидативного стресса.

Результаты исследования оксидативного статуса сперматозоидов могут быть ис-

пользованы при дифференциальной диагностике мужского идиопатического бесплодия (бесплодия неясного генеза). Пациентам с выраженным оксидативным стрессом целесообразно принимать антиоксидантную терапию, после консультации врача-специалиста, позволяющую предотвратить усугубление патологии.



Рис. 3. Уровень оксидативного стресса в группе пациентов с олигоастенозооспермией

Выводы:

1. Уровень оксидативного стресса у доноров (контрольная группа) в 80 % случаев характеризовался как очень низкий и в 20 % – как низкий.

2. У мужчин с предполагаемым бесплодием в случае нормозооспермии уровень оксидативного стресса определялся как очень низкий (60 %), низкий (20 %) и средний (20 %).

3. В случае олигоастенозооспермии уровень оксидативного стресса определялся как высокий в 80 % случаев и как средний у 20 % пациентов.

Результаты проведенного исследования подтверждают патогенетическую взаимосвязь оксидативного стресса и сперматогенеза, а также негативного влияния АФК на параметры эякулята у мужчин с олигоастенозооспермией.

Литература / References

- 1 Dindyaev, S.V., Vinogradov S.YU. Embriologiya: uchebnik i praktikum dlya srednego professional'nogo obrazovaniya. – 2-e izd., ispr. i dop. – Moscow: YUrajt, 2020. – 347 s.
- 2 Bykova M.V. Narushenie redoks-balansa spermatozoidov i semennoj plazmy muzhchin pri patospermii: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. – Krasnoyarsk, 2008. – 24 s.
- 3 Vladimirov YU.A., Azisova O.A., Deev A.I. Svobodnye radikaly v zhivyyh sistemah // Itogi nauki i tekhniki. – 1991. – № 29. – С. 243–249.
- 4 Vsemirnaya organizaciya zdavoohraneniya Rukovodstvo VOZ po issledovaniyu i obrabotke eyakulyata cheloveka. – 5-e izd. – Moscow: ZAO «Kapital print», 2012. – 292 s.
- 5 Zenkov N.K. Okislitel'nyj stress: Biohimicheskij i patofiziologicheskij aspekty. – Moscow: MAIK «Nauka / Interperiodika», 2001. – 343 c.
- 6 Kulinskij V.I. Aktivnye formy kisloroda i oksidativnaya modifikaciya makromolekul: pol'za, vred i zashchita // Sorosovskij obshcheobrazovatel'nyj zhurnal. – 1999. – № 1. – С. 2–7.
- 7 CHalyj M.E., Ahvlediani N.D., Harchilava R.R. Muzhskoe besplodie. Rossijskie klinicheskie rekomendacii // Urologiya. – 2016. – № 1. – С. 2–16.
- 8 Bozhedomov V.A. Muzhskoe besplodie // Andrologiya. Klinicheskie rekomendacii / pod red. P.A. SHchepleva. – 2012. – С. 30–58.
- 9 Bozhedomov V.A., Lipatova N.A., Sporish E.A. i soavt. // Andrologiya i genital'naya hirurgiya. – 2012. – № 3. – С. 83–91.
- 10 Bozhedomov V.A., Nikolaeva M.A., Ushakova I.V. i soavt. // Akusherstvo i ginekologiya. – 2012. – № 8/2. – С. 64–69.

- 11 Bozhedomov V.A., Semenov A.V., Sotnikova N.YU. i soavt. // Andrologiya i genital'naya hirurgiya. – 2013. – № 2. – S. 85–86.
- 12 Bozhedomov V.A., Toropceva M.V., Ushakova I.V. i dr. Aktivnye formy kisloroda i reproduktivnaya funkciya muzhchin: fundamental'nye i klinicheskie aspekty (obzor literatury) // Andrologiya i genital'naya hirurgiya. – 2011. – № 3. – S. 10–613.
- 13 Vorob'eva O.A., Korsak B.C., Leont'eva O.A. Vliyanie morfologii spermatozoidov na chastotu oplo-dotvoreniya i narusheniya razvitiya embrionov v programme EKO // Citologiya. – 1996. – Т. 38. – № 2. – S. 1248–1254.
- 14 Bragina E. Kolichestvennoe elektronno-mikroskopicheskoe issledovanie spermatozoidov pri diagnostike mu-zhskogo besplodiya / E.E. Bragina, E.N. Bocharova // Andrologiya i genital'naya hirurgiya. – 2014. – № 1. – S. 41–50.

Авторская справка

**Шурыгина Оксана
Викторовна**

доктор медицинских наук, доцент, Самарский государственный медицин-
ский университет, Самара, Россия
заведующая лабораторией вспомогательных репродуктивных технологий,
Медицинская компания ИДК, Самара, Россия
e-mail: Oks-shurygina@yandex.ru

**Беляева Лидия
Александровна**

очный аспирант кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государ-
ственный медицинский университет, Самара, Россия
e-mail: Llibel@mail.ru

**Русаков Дмитрий
Юрьевич**

кандидат медицинских наук, врач уролог-андролог, Самарский государ-
ственный медицинский университет, Самара, Россия
e-mail: Dmitriyrusakov@yahoo.com

**Юхимец Сергей
Николаевич**

кандидат медицинских наук, доцент кафедры морфологии и патологии,
Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия
e-mail: Y_s_n@mail.ru

**Ратенкова Наталья
Васильевна**

биолог-эмбриолог, ГБУ Республиканский центр охраны здоровья семьи и
репродукции, Махачкала
e-mail: ratenkova333@mail.ru

**Попова Ольга
Олеговна**

соискатель кафедры гистологии, Самарский государственный медицинский
университет, Самара, Россия