



Научный центр
акушерства,
гинекологии
и перинатологии
им. академика
В.И. Кулакова, Москва

Применение продукта Бруди Плюс в лечении бесплодия у пациентов с повышенным индексом фрагментации ДНК сперматозоидов

А.Ю. Попова, С.И. Гамидов, Р.И. Овчинников

Адрес для переписки: Алина Юрьевна Попова, a_porova@oparina4.ru

Представлены результаты исследования, в котором оценивалось влияние докозагексаеновой кислоты триглицерида в высокой концентрации (продукта Бруди Плюс) на поврежденную ДНК сперматозоидов у пациентов с идиопатической патозооспермией. Докозагексаеновая кислота – наиболее ценная для здоровья человека полиненасыщенная жирная кислота омега-3, важнейший компонент серого вещества мозга, сетчатки глаза, яичек, спермы и клеточных мембран. По результатам некоторых зарубежных и российских исследований в области репродукции, прием докозагексаеновой кислоты способствует уменьшению индекса фрагментации ДНК сперматозоидов. В ходе исследования были получены положительные результаты. Прием три-докозагексаеновой кислоты способствовал снижению уровня повреждения ДНК сперматозоидов, а также позволил усилить антиоксидантную систему спермы.

Ключевые слова: мужское бесплодие, фрагментация ДНК сперматозоидов, докозагексаеновая кислота, спермограмма, лечение бесплодия

Введение

В настоящее время мужской фактор является причиной бесплодия в браке почти в половине случаев, как изолированно, так и наряду с другими причинами [1]. Актуальность проблемы мужского бесплодия не вызывает сомнений,

а методы диагностики и лечения остаются не до конца изученными. Сегодня спермограмма (микроскопическое исследование качества спермы) – самый простой вид исследования сперматозоидов, который, к сожалению, дает неполную информацию о возможных

нарушениях сперматогенеза [2]. Все большее число исследований, опубликованных в зарубежной и отечественной литературе, указывает на то, что доля сперматозоидов с хромосомными нарушениями наследственного материала очень важна, с одной стороны, для способности к оплодотворению, а с другой – для установления риска репродуктивных потерь [3]. Однако показатель генетической целостности сперматозоида – индекс фрагментации нельзя определить с помощью обычной спермограммы.

Фрагментация ДНК сперматозоидов – относительно недавно открытая, интенсивно исследуемая в последнее десятилетие причина мужского бесплодия и нарушений раннего эмбрионального развития, связанных с генотипом отца [4]. Основными факторами разрывов ДНК считают процессы изменения структуры хроматина в ходе сперматогенеза и апоптоза. Апоптоз – программируемая гибель клетки, проявляющаяся в уменьшении ее размера, конденсации (уплотнении) и фрагментации хроматина, уплотнении наружной и цитоплазматической



мембран без выхода содержимого клетки в окружающую среду. Для оценки фрагментации ДНК и апоптотических маркеров сперматозоидов в настоящее время разработан целый ряд методических подходов [5]. Высокий процент сперматозоидов с повреждениями ДНК не всегда коррелирует с обычными параметрами спермограммы. В то же время фрагментация ДНК сперматозоидов может оказывать влияние на ранние этапы эмбрионального развития, особенно на формирование blastocysts и частоту наступления беременности в циклах экстракорпорального оплодотворения и интрацитоплазматической инъекции сперматозоида [6].

Начинают разрабатываться подходы к преодолению повышенного уровня фрагментации ДНК сперматозоидов. В последнее время в спермиологических лабораториях чаще всего используют методы анализа фрагментации ДНК в клетках и ткани, такие как обнаружение апоптотических клеток с помощью метода TdT-опосредованной метки dUTP-конца разрыва цепи ДНК (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling – TUNEL) и конечной маркировки (In Situ End-Labeling – ISEL). Данные подходы позволяют выявить изменения ДНК на самых ранних стадиях апоптоза до того, как появятся тельца апоптоза: фрагментированная ДНК в виде глыбок хроматина в ядре или в цитоплазматических каплях вне клетки. Метод TUNEL, получивший наиболее широкое распространение, способен регистрировать нарушение целостности ДНК сперматозоидов, которое связано с упаковкой патологического хроматина или дефицитом протамина, оказывающее негативное влияние на репродуктивные исходы при естественном зачатии или в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

У бесплодных мужчин доля сперматозоидов с нарушением целостности ДНК превышает 30%, а у здоровых фертильных муж-

чин – составляет менее 15%. При уровне фрагментации ДНК спермы $\geq 30\%$ вероятность наступления беременности крайне низкая [7]. С распространением ВРТ пришло понимание важности последствий повреждения ДНК спермы, но на сегодняшний день эти последствия еще в значительной степени неизвестны [8].

Выделяют следующие причины нарушения хроматина – повреждения ДНК сперматозоидов:

- первичные или внутренние дефекты сперматогенеза (аномалии развития или генетические дефекты);
- вторичные или внешние повреждения тестикул (гонадотоксин, гипертермия, окислительный стресс, эндокринные заболевания).

У больных с идиопатическим бесплодием и значительно повышенным количеством сперматозоидов со сниженной степенью конденсации хроматина наблюдаются дефицит протаминов, активные формы кислорода, нарушения апоптоза и замены гистонов на протамины в сперматиде, плохая упаковка хроматина, а также усиление чувствительности к окислительному стрессу дефектных сперматозоидов [9].

Между тем в клинической практике важно не только выявить нарушения, но и назначить лечение пациентам с повышенным индексом фрагментации ДНК спермы.

Мы проанализировали работы зарубежных авторов, согласно которым липидный состав клеточных мембран сперматозоидов существенно влияет на функциональные характеристики сперматозоидов [10]. В сперматозоидах человека были также обнаружены длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты в высокой концентрации [11, 12]. Установлено, что их доля по отношению к насыщенным жирным кислотам и холестерину тесно связана с текучестью мембран сперматозоидов [13]. Благодаря большому количеству двойных связей полиненасыщенные жирные кислоты в мембранах сперматозоидов особенно восприимчивы к пе-

рекисному разрушению [14]. Это имеет большое значение при криоконсервации, когда увеличивается общее количество образовавшихся активных соединений кислорода [15] и нарушается баланс компонентов антиоксидантной системы [16–18]. Содержание полиненасыщенных жирных кислот омега-3 и особенно докозагексаеновой кислоты положительно коррелирует с подвижностью и жизнеспособностью сперматозоидов после замораживания/размораживания. Значит, жирнокислотный состав может быть прогностическим критерием антиоксидантного потенциала эякулята. Кроме того, влияя на липидный состав сперматозоидов, можно ожидать положительный антиоксидантный терапевтический эффект [19–21].

Цель исследования

Оценка влияния энзиматической докозагексаеновой кислоты триглицерида в высокой концентрации (Бруди Плюс) на поврежденную ДНК сперматозоидов.

Материал и методы

В исследование были включены 100 больных с идиопатической патозооспермией и уровнем фрагментации ДНК, превышающим нормативные значения. Индекс фрагментации ДНК спермы определяли с помощью метода TUNEL (норма до 15%). Все пациенты дали согласие на участие в данной работе.

Критерии включения: возраст старше 18 лет, патозооспермия, подтвержденная стандартной спермограммой, повышенный уровень фрагментации ДНК спермы, информированное согласие.

Критерии исключения: повышенный или сниженный уровень лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормона, тяжелые поражения сперматогенеза (криптозооспермия и некрозооспермия), эндокринные и генетические нарушения, тяжелые соматические заболевания, двустороннее поражение придатков и яичек воспалительного и травматического характера, варикоцеле.

Урология



Возраст пациентов, включенных в исследование, составил 22–48 лет (средний возраст $30,2 \pm 6,6$ года). Кроме анализа жалоб, сбора анамнеза и физикального обследования все больные прошли андрологическое обследование:

- исследование спермограммы по стандартной методике, рекомендованной Всемирной организацией здравоохранения (2010);
- определение уровня половых гормонов крови, ингибина В;
- ультразвуковое исследование (УЗИ) и доплерографию сосудов органов мошонки;
- генетические исследования (кариотип, фактор азооспермии, ген муковисцидоза);
- исследование фрагментации ДНК в сперматозоидах методом TUNEL.

Вычисление процента сперматозоидов с нарушением целостности ДНК производили с помощью набора реактивов фирмы Millipore (США). На предметное стекло, покрытое Polysine (Thermo, Германия), наносили препарат сперматозоидов, отмытых от спермальной жидкости. Препарат высушивали в 1%-ном растворе параформальдегида в течение десяти минут. Дважды промывали в фосфатном буфере и помещали в раствор этилового спирта и уксусной кислоты (2:1) на пять минут при 20 °С. Затем дважды промывали в фосфатном буфере. На препарат наносили раствор фермента TdT (период инкубации 60 минут), затем раствор, содержащий флуоресцентный краситель (родамин), и инкубировали 30 минут. Дважды

промывали в фосфатном буфере и инкубировали в растворе ядерного флуоресцентного красителя DAPI в течение пяти минут. Затем препарат четыре раза промывали в фосфатном буфере и помещали под покрывное стекло. Анализ проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus с двумя фильтрами длиной волны 350 и 560 нм. Препарат просматривали в нескольких полях зрения и оценивали 1000 клеток. Полученные изображения анализировали в программе Image-Pro для подсчета количества ядер сперматозоидов с фрагментацией ДНК и общего количества неповрежденных ядер. Подсчитывали процент (среднее значение) фрагментированных ядер в препарате. После комплексного андрологического обследования всем пациентам с патозооспермией и повышенным индексом фрагментации ДНК спермы был назначен Бруди Плюс (три-докозагексаеновая кислота в высокой концентрации). Повторное обследование (спермограмма и оценка фрагментации ДНК спермы методом TUNEL) было выполнено спустя полтора и три месяца приема продукта.

Анализ клинических данных проводили с помощью стандартных методов статистической обработки с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 10.0 и Statistica 7.0. Для проверки статистических гипотез были использованы t-критерий Стьюдента (для анализа выборок с распределением, приближенным к нормальному) и точный критерий Фишера. Для всех критериев

и тестов критический уровень значимости (если не оговорено иное) принимали равным 5%, то есть нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

Результаты

Сбор анамнеза показал, что ни один пациент не подвергался воздействиям ионизирующего излучения, не употреблял наркотические средства, а также алкоголь. Некоторые пациенты имели избыточную массу тела (35,4%) и ожирение разной степени тяжести (16,5%), средний индекс массы тела в группе составил $29,7 \pm 7$. С помощью имеющейся медицинской документации и сбора анамнеза, к сожалению, выявить этиологию патозооспермии у пациентов не представлялось возможным.

Внешние признаки гипогонадизма у больных отсутствовали. При пальпации органов мошонки – объем яичек нормальный. По данным УЗИ предстательной железы у 62,7% больных были выявлены ультразвуковые признаки хронического простатита. Результаты УЗИ органов мошонки патологических изменений не показали. При цветовом доплеровском картировании сосудов органов мошонки патологический рефлюкс на высоте пробы Вальсальвы не зарегистрирован. Результат стандартного спермиологического исследования – диагноз «патозооспермия», причем 38% больных имели астенозооспермию, 23% – астенотератозооспермию, 9% – тератозооспермию, 11% – олигоастенозооспермию, 19% – олигоастенотератозооспермию. По данным анализа крови на гормоны изменения в средних показателях гормонов (фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормона, тестостерона, пролактина) не отмечены. У всех пациентов был повышен уровень фрагментации ДНК (TUNEL), который варьировал от 19,8 до 38,7%. Средний уровень фрагментации ДНК составил $25,3 \pm 5,2\%$ (рис. 1). При этом выраженность патозооспермии коррелировала

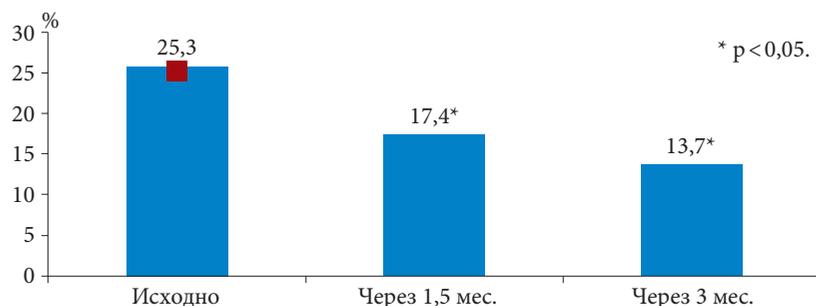


Рис. 1. Распределение по среднему уровню фрагментации ДНК спермы до лечения, через полтора и три месяца лечения



с повышенным индексом фрагментации ДНК спермы. Уровень фрагментации ДНК у пациентов с олигоастенотератозооспермией был $38,5 \pm 5,6\%$, астенозооспермией – $22,3 \pm 4,5\%$, тератозооспермией – $19,3 \pm 3,5\%$.

Результаты анализа полученных данных после лечения показали высокую эффективность применения Бруди Плюс. У всех пациентов отмечалось снижение уровня фрагментации ДНК спермы. Средний уровень фрагментации ДНК составил $13,7\%$ ($p < 0,05$). Интересно, что снижение уровня фрагментации ДНК было отмечено у 63% больных уже спустя полтора месяца приема Бруди Плюс, что особенно важно при подготовке пациентов к программам ВРТ, когда сроки лечения ограничены. Кроме того, у пациентов, принимающих Бруди Плюс, увеличилась подвижность сперматозоидов – на 12–45% от начала терапии (рис. 2).

Обсуждение

Существует ряд доказательств того, что уровень фрагментации ДНК спермы может снизиться после коррекции этиологических причин, вызвавших нарушение целостности ДНК спермы, например после устранения варикоцеле (варикоцелеэктомия). Предполагается, что лечение инфекции с помощью антибиотиков, нивелируя негативное влияние окислительного стресса, тоже уменьшит уровень фрагментации ДНК.

Полученные нами данные показывают, что некоторые причины фрагментации ДНК не могут быть диагностированы, но иногда благодаря изменению образа жизни, соблюдению диеты, а также с помощью приема препаратов, предназначенных для защиты от окислительного стресса, можно корригировать ущерб от свободных радикалов и снизить уровень фрагментации ДНК.

Была продемонстрирована высокая эффективность Бруди Плюс у больных с идиопатической патозооспермией и повышенным уровнем фрагментации ДНК. Средний

уровень фрагментации ДНК снизился с 25,8 до 13,7% после третьего месяца приема Бруди Плюс ($p < 0,05$).

Установлено, что степень повреждения сперматогенеза коррелирует с повышенными значениями фрагментации ДНК спермы. У пациентов с более выраженными нарушениями сперматогенеза уровень фрагментации ДНК составил $38,5 \pm 5,6\%$. Полученные результаты отвечают данным отечественной и зарубежной литературы. Однако данный факт требует дальнейшего изучения, так как нет четкой зависимости уровня фрагментации ДНК ни от одного из показателей спермограммы (концентрации, подвижности, морфологии). Кроме того, нарушение целостности структуры ДНК спермы может встречаться у пациентов с нормальными показателями спермограммы.

Положительное влияние три-докозагексаеновой кислоты в высокой концентрации (Бруди Плюс) отмечалось у 63% больных уже спустя полтора месяца применения продукта, что особенно важно при подготовке пациентов к программе ВРТ. Это связано с тем, что время терапии ограничено, а результативность экстракорпорального оплодотворения и/или интрацитоплазматической инъекции сперматозоида может зависеть от уровня фрагментации ДНК [22].

После первого положительного опыта применения продукта Бруди Плюс в нашей клинике (в 2014 г.) мы уже на протяжении трех лет широко назначаем Бруди Плюс пациентам с идиопатической патозооспермией и нарушением целостности структуры ДНК сперматозоидов как отдельно, так и в комбинации с препаратами, стимулирующими сперматогенез. Получены положительные результаты применения Бруди Плюс при естественном зачатии и в программах ВРТ.

Перспективные направления исследований – оценка эффективности применения Бруди Плюс

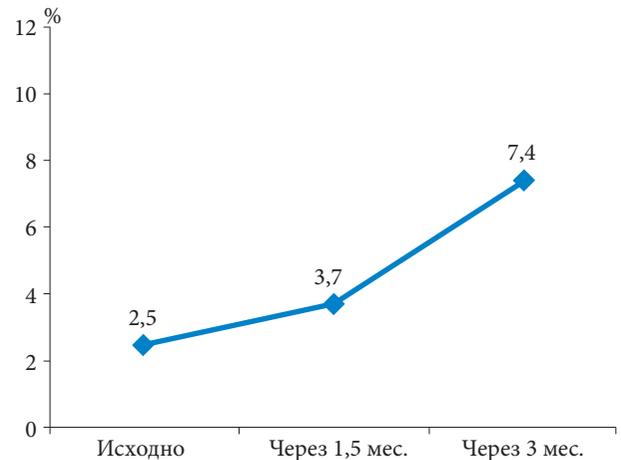


Рис. 2. Динамика активности сперматозоидов (категории А) до лечения, через полтора и три месяца лечения

у разных категорий больных, а также выявление ассоциации между снижением уровня фрагментации ДНК и репродуктивными исходами в бесплодных парах, которые применяют ту или иную терапию, направленную на коррекцию нарушений целостности ДНК спермы.

Заключение

Учитывая современные международные данные о выявленной корреляции повышенного уровня фрагментации ДНК и репродуктивных потерь, установление нарушения целостности ДНК сперматозоидов важно не только с диагностической точки зрения, но и с клинической. Особенно для супружеских пар, у которых есть субфертильные показатели спермограммы, а также пар, планирующих вступить в программу ВРТ.

На сегодняшний день опубликовано достаточное количество работ, в том числе зарубежных, по доказательству эффективности применения Бруди Плюс у пациентов с повышенным уровнем фрагментации ДНК спермы. Продолжая исследования в этом направлении, клиницисты смогут эффективнее влиять на нарушение структуры ДНК сперматозоидов, что позволит повысить фертильность мужчин и результативность различных методов достижения беременности. 🌐



Литература

1. Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R. et al. Guidelines on male infertility / European Association of Urology, 2015 // www.uroweb.org/wp-content/uploads/17-Male-Infertility_LR1.pdf.
2. Guzick D.S., Overstreet J.W., Factor-Litvak P. et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men // N. Engl. J. Med. 2004. Vol. 345. № 19. P. 1388–1393.
3. Osman A., Alsomait H., Seshadri S. et al. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis // Reprod. Biomed. Online. 2015. Vol. 30. № 2. P. 120–127.
4. Gandini L., Lombardo F., Paoli D. et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa // Hum. Reprod. 2000. Vol. 15. № 4. P. 830–839.
5. Evenson D.P. Sperm chromatin structure assay (SCSA®) // Methods Mol. Biol. 2013. Vol. 927. P. 147–164.
6. Kumar K., Deka D., Singh A. et al. Predictive value of DNA integrity analysis in idiopathic recurrent pregnancy loss following spontaneous conception // J. Assist. Reprod. Genet. 2012. Vol. 29. № 9. P. 861–867.
7. Spanò M., Bonde J.P., Hjøllund H.I. et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team // Fertil. Steril. 2000. Vol. 73. № 1. P. 43–50.
8. Zini A., Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction // Curr. Opin. Urol. 2006. Vol. 16. № 6. P. 428–434.
9. Zini A., Albert O., Robaire B. Assessing sperm chromatin and DNA damage: clinical importance and development of standards // Andrology. 2014. Vol. 2. № 3. P. 322–325.
10. Nogales-Gadea G., Pinós T., Ruiz J.R. et al. Are mitochondrial haplogroups associated with elite athletic status? A study on a Spanish cohort // Mitochondrion. 2011. Vol. 11. № 6. P. 905–908.
11. Ahluwalia B., Holman R.T. Fatty acid composition of lipids of bull, boar, rabbit and human semen // J. Reprod. Fertil. 1969. Vol. 18. № 3. P. 431–437.
12. Poulos A., White I.G. The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma // J. Reprod. Fertil. 1973. Vol. 35. № 2. P. 265–272.
13. Lenzi A., Picardo M., Gandini L., Dondero F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy // Hum. Reprod. Update. 1996. Vol. 2. № 3. P. 246–256.
14. Alvarez J.G., Storey B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa // Mol. Reprod. Dev. 1995. Vol. 42. № 3. P. 334–346.
15. Wang A.W., Zhang H., Ikemoto I. et al. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation // Urology. 1997. Vol. 49. № 6. P. 921–925.
16. Alvarez J.G., Storey B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation // J. Androl. 1992. Vol. 13. № 3. P. 232–241.
17. Lasso J.L., Noiles E.E., Alvarez J.G., Storey B.T. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation // J. Androl. 1994. Vol. 15. № 3. P. 255–265.
18. Gadea J., Molla M., Selles E. et al. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders // Cryobiology. 2011. Vol. 62. № 1. P. 40–46.
19. Agarwal A., Sekhon L.H. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility // Hum. Fertil. (Camb.). 2010. Vol. 13. № 4. P. 217–225.
20. Safarinejad M.R. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic antioxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a double-blind, placebo-controlled, randomised study // Andrologia. 2011. Vol. 43. № 1. P. 38–47.
21. Zini A., Al-Hathal N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? // Asian J. Androl. 2011. Vol. 13. № 3. P. 374–381.
22. Larson-Cook K.L., Brannian J.D., Hansen K.A. et al. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay // Fertil. Steril. 2003. Vol. 80. № 4. P. 895–902.

Use of Product Brudi Plus in the Treatment of Infertility in Patients with a High Index of DNA Fragmentation of Sperm

A.Yu. Popova, S.I. Gamidov, R.I. Ovchinnikov

V.I. Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

Contact person: Alina Yuryevna Popova, a_popova@oparina4.ru

Presented the results of a study which assessed the effect of acid triglyceride (product Brudi Plus) in high concentrations on damaged sperm DNA in patients with idiopathic pathozoospermia. Docosahexaenoic acid is the most valuable for human health polyunsaturated fatty acid omega-3. Docosahexaenoic acid is a major component of the gray matter of the brain, retina, testis, sperm and cell membranes. According to the results of some foreign and russian researches in the field of reproduction, intake of docosahexaenoic acid helps to reduce fragmentation of sperm DNA. In the study positive results were obtained. Application of tridocosahexaenoic acid contributed to the decrease in the damage level of sperm DNA, and also led to the improvement of the antioxidant system of sperm.

Key words: male infertility, DNA fragmentation sperm, docosahexaenoic acid, semen analysis, infertility treatment



брудиплюс[®] МЕЧТАЕТЕ О МАЛЫШЕ?

**Брудиплюс! Способствует
увеличению шансов
на беременность! ***

Заказ по телефону +7 (495) 997-99-41 www.brudyplus.ru

* Попова А.Ю. и соавт. Опыт применения докозагексаеновой кислоты (Брудиплюс) у пациентов с повышенным индексом фрагментации ДНК сперматозоидов в Научном центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова. Андрология и генитальная хирургия, 2015, №2. – С. 1-5. the common cold: an observational study// Explore, 2006; 2:109-114.



BRUDYTECHNOLOGY[®]

Производитель

БРУДИ ТЕКНОЛОДЖИ, С. Л.

К. Риера де Сан-Мигель, 3, 2-е, 4а.

08006 – БАРСЕЛОНА (ИСПАНИЯ)

Тел.: 93 217 03 66. Факс: 93 217 78 41

www.brudyplus.ru



Дистрибьютор

ЗАО «Фирма ЕВРОСЕРВИС»

142717, Московская область, Ленинский район,

с/п «Развилковское», пос. Развилка, квартал 1, влад. 7

Тел./факс: +7 (495) 789 46 19 (доб. 311 – тел. Аптеки)

E-mail: brudyplus@euro-service.ru

**Дополнительная
информация на сайте
www.brudyplus.ru**