

Влияние ожирения на индекс фрагментации ДНК сперматозоидов и исходы программ ЭКО

К.м.н. И.И. ВИТЯЗЕВА, М.В. АЛТАШИНА, к.м.н. Т.В. МУН, проф. Е.А. ТРОШИНА

ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия

Снижение рождаемости в развитых странах и увеличение частоты мужского бесплодия способствуют интенсивному поиску факторов, негативно влияющих на репродуктивную систему мужчин. Причиной бесплодия у мужчин репродуктивного возраста может быть избыточная масса тела и ожирение. Одним из механизмов негативного влияния избытка жировой ткани на фертильность мужчин является нарушение сперматогенеза. Представлены данные литературы о макроскопических и ультраструктурных нарушениях сперматогенеза у мужчин с ожирением. Приведены данные, полученные в отделении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) ФГБУ ЭНЦ МЗ РФ, о связи между индексом массы тела (ИМТ), параметрами спермограммы и индексом фрагментации ДНК сперматозоидов, а также о влиянии ИМТ мужчин на исходы программ ЭКО.

Ключевые слова: бесплодие, ожирение, избыточная масса тела, мужчины, сперматозоид, спермограмма, фрагментация ДНК, вспомогательные репродуктивные технологии, биохимическая беременность, репродуктивные потери, экстракорпоральное оплодотворение.

Influence of obesity on sperm DNA fragmentation index and outcomes of IVF programs

I.I. VITIAZEVA, M.V. ALTASHINA, T.V. MUN, E.A. TROSHINA

Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

The reduction of the birth rates in the developed countries and increase in the frequency of male infertility stimulate the extensive investigations for the factors that negatively affect the reproductive system of the men and causing their infertility. The excessive body weight and obesity in the men of the reproductive age can promote the development of infertility. One of the mechanisms by which excess fat tissue has a negative impact on male fertility is disturbance of spermatogenesis. The authors aggregate scientific publications concerning the macroscopic and ultrastructural disturbances of spermatogenesis in men with obesity. We present the results of the study conducted at the Department of ART Endocrinology Research Center, targeted at the revelation of the relationship of body mass index of men of reproductive age, semen parameters, sperm DNA fragmentation index, as well as the influence of body mass index on outcomes of in vitro fertilization programs.

Keywords: infertility, obesity, overweight, male, sperm, semen, dna fragmentation, assisted reproductive technology, biochemical pregnancy, reproductive loss, in vitro fertilization.

doi: 10.14341/probl201561548-55

Снижение рождаемости в развитых странах — одна из важнейших современных социально-экономических проблем [1]. По данным российских исследователей [2, 3], бесплодны от 8 до 18% супружеских пар репродуктивного возраста. Мужской фактор является причиной бесплодия в браке не менее чем в 50% случаев, а в 20—30% случаев имеется сочетание мужского и женского факторов [4].

Мужское бесплодие может быть следствием различных эндокринных, генетических, иммунологических, инфекционных, психологических и других факторов. Основными причинами эндокринного бесплодия у мужчин считаются заболевания гипоталамо-гипофизарной области: нарушение секреции гонадотропных гормонов приводит к угнетению сперматогенеза. Не исключено и негативное влияние избыточной массы тела и ожирения на мужскую репродуктивную систему [5, 6]. В мире за последние 30 лет число страдающих ожирением мужчин репродуктивного возраста увеличилось в 3 раза, что, по

мнению ряда авторов [1, 7, 8], является причиной ухудшения семиологических показателей и возрастания частоты мужского бесплодия.

Современный семиологический анализ, спермограмма, — это начальный и основной тест, позволяющий выявить радикальные формы спермальной дисфункции, такие как азооспермия (полное отсутствие сперматозоидов в эякуляте), криптозооспермия (единичные сперматозоиды в эякуляте после центрифугирования) и тяжелая олигоастенотератозооспермия (снижение концентрации, двигательной активности и числа морфологически нормальных сперматозоидов). Вместе с тем примерно у 15% мужчин, страдающих бесплодием в браке, сохраняя-

Сведения об авторах:

Витязева И.И. — к.м.н. ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва; e-mail: vitiazeva@yandex.ru;

Алташина М.В. — ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва;

Мун Т.В. — к.б.н. ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва;

Трошина Е.А. — проф. ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва;

ется нормальная концентрация и морфология сперматозоидов, а также достаточное количество прогрессивно подвижных гамет [9].

Оценка морфологии мужской половой клетки под световым микроскопом не позволяет визуализировать состояние ее внутренних структур (например, целостность ДНК, степень компактизации хроматина, наличие нормальной проксимальной центриоли и т.п.). Это заставляет искать новые способы диагностики причин мужского бесплодия [10].

Геном сперматозоида имеет две особенности, которые отличают его от генома соматических клеток: протаминирование ДНК и неспособность ДНК к репарации. ДНК мужской половой клетки сверхкомпактизирована с помощью протаминов — основных белков небольшой молекулярной массы, богатых аргинином. Такая сверхспирализация ДНК обеспечивает стабильность, транскрипционную инертность и защиту отцовского генома при перемещении по половым путям мужчины и женщины. Способность к репарации ДНК, как и процессы транскрипции и трансляции, теряются на конечной стадии сперматогенеза (спермиогенез), когда сперматиды превращаются в зрелые сперматозоиды.

Таким образом, сперматозоиды лишены способности исправлять повреждения, полученные в период пребывания в эпидидимисе и после эякуляции [11]. Изменения структуры ДНК приводят не только к невозможности оплодотворения и нормального развития эмбриона в преимплантационном периоде, но и к нарушению имплантации и преждевременному прерыванию беременности на ранних сроках гестации [12—15].

Фрагментация ДНК сперматозоидов — относительно недавно идентифицированная причина мужской инфертильности. Степень повреждения ДНК — индекс фрагментации (ИФ) — рассчитывают как отношение числа сперматозоидов с поврежденной ДНК на 100 исследуемых сперматозоидов. При ИФ 25—30% потенциал наступления спонтанной беременности считается удовлетворительным, при ИФ 15—24% — хорошим, при ИФ <15% — высоким [15, 16]. В случае ИФ >30% вероятность наступления беременности (как спонтанной, так и в результате ЭКО) крайне низка [17, 18]. Высокие показатели фрагментации ДНК сперматозоидов выявляются у 25,6% пациентов с бесплодием [19].

Программы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) помогают преодолеть большинство форм патологии эякулята и сперматозоида, таких как снижение количества (олигозооспермия) и подвижности (астенозооспермия) клеток, наличие антиспермальных антител, нарушение вязкости эякулята. Однако нарушения ультраструктуры сперматозоида остаются на сегодняшний день нерешенной проблемой. Имеются сообщения о том, что при повышенном ИФ ДНК риск невынашивания бере-

менности в программах ЭКО (особенно при интрацитоплазматической инъекции единичного сперматозоида в яйцеклетку, ИКСИ) возрастает в 4 раза [9].

Патофизиологические механизмы, ведущие к фрагментации ДНК сперматозоидов, недостаточно ясны. Известно, что причиной повышения ИФ ДНК могут быть внешние условия (особенно актуальные при ЭКО), такие как время, прошедшее после эякуляции и температура хранения эякулята [11]. Менее изучена роль эндогенных факторов, воздействующих на мужские половые клетки, на протяжении сперматогенеза (рис. 1).

К основным формам повреждения ДНК сперматозоидов относятся разрывы одной или двух цепей ДНК, модификация оснований, присоединение лишних оснований, димеризация пиримидина, окисление. В ответ на повреждение ДНК происходит ее репарация, арест клеточного цикла, апоптоз, мутации *de novo*, нарушается ответ на стресс.

Одним из негативных внутренних факторов, по мнению С. Dupont и соавт., является ожирение, что, соответственно, и может приводить к той или иной форме мужского бесплодия [20].

Ожирение и фрагментация ДНК

На протяжении последних десятилетий во всем мире отмечается прогрессивное ухудшение семиологических показателей. Количество сперматозоидов в эякуляте у американских мужчин репродуктивного возраста ежегодно уменьшается на 1,5%. Подобная тенденция наблюдается в Европе и Австралии [21]. Отмечается также увеличение числа супружеских пар, обращающихся за ЭКО по поводу мужского фактора бесплодия [7, 8]. Все больше данных свидетельствует о том, что на фертильность мужчин негативно влияет ожирение, однако механизмы, посредством которых избыток жировой ткани воздействует на мужскую репродуктивную систему, мало изучены.

Жировая ткань способна не только конвертировать андрогены в эстрогены, но и секретировать множество биологически активных веществ (адипокинов), регулирующих работу гипоталамо-гипофизарно-яичковой оси и влияющих на сперматогенез. Изменения концентрации адипокинов при ожирении могут влиять на репродуктивную систему мужчины как непосредственно, так и в результате формирования инсулинорезистентности, которая выявляется у 50% мужчин с нарушением жирового обмена [22].

В формировании инсулинорезистентности важную роль играют лептин, адипонектин и резистин; высокие концентрации провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-8 и С-реактивного белка (С-РБ) обуславливают характерное для ожирения состояние хронического воспаления и оксидатив-

ного стресса [1]. Оксидативный стресс приводит к увеличению одно- и двуцепочечных разрывов хроматина в головке сперматозоида, ослаблению акросомальной реакции, что в свою очередь снижает частоту оплодотворения (fertility rate — FR), вероятность имплантации эмбрионов (implantation rate, IR) и наступления беременности (pregnancy rate — PR) в программах ЭКО [23, 24]. С увеличением ИФ ДНК сперматозоидов частота эмбрионов с патологическим количеством пронуклеусов (>2) возрастает с 8 до 20% случаев [25, 26].

T. Jensen и соавт. при обследовании 1558 молодых мужчин в возрасте 18—21 года с ИМТ 25 кг/м² и более выявили снижение концентрации и общего количества сперматозоидов в эякуляте на 21,6 и 23,9% соответственно по сравнению с мужчинами с нормальным ИМТ. Количество морфологически нормальных сперматозоидов при ИМТ 25 кг/м² и более также было снижено [1]. С. Dupont и соавт. в исследовании с участием 3030 бесплодных мужчин (средний возраст 37,6±6,2 года, средний ИМТ 25,8±4,0 кг/м²) нашли, что количество поврежденных ДНК сперматозоидов, выявляемых методом TUNEL, у пациентов с ожирением было в 3,9 выше, чем у мужчин с нормальным ИМТ [27]. При использовании метода COMET была выявлена положительная зависимость между нарушением жирового обмена и числом сперматозоидов с фрагментацией ДНК [28]. В других работах связь между ожирением у мужчины и ухудшением макроскопических показателей эякулята, а также числом повреждений ДНК не нашла подтверждения [29].

Важно отметить, что среди детей, рожденных от мужчин с ожирением, возрастает частота ожирения, сахарного диабета (СД), нарушений репродуктивной функции, а также аутизма [30].

Методы исследования структуры ДНК

Для выявления нарушения структуры ДНК сперматозоидов применяются прямые и непрямые методы.

С помощью прямых методов выявляют уже имеющиеся поломки ДНК; непрямые методы позволяют оценить подверженность спермальной ДНК повреждениям после внешнего воздействия, например добавления уксусной кислоты. Наиболее широко используемыми прямыми методами являются TUNEL, NT, COMET [31].

В основе метода TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Nick End Labeling) лежит присоединение флуоресцентномеченых нуклеотидов к 3'-гидроксильному концу фрагмента разрушенной ДНК. Визуализация встроенных фрагментов возможна с помощью люминисцентного микроскопа и проточной цитометрии. При NT (ник-трансляции, In-Situ Nick Translation assay) к 3'-ги-

дроксильному концу ДНК присоединяются радиоактивные нуклеотидные остатки [31—33].

Метод COMET (Single Cell Gel Electrophoresis) предполагает обработку сперматозоидов лизирующими растворами для экстракции белков, после чего проводят электрофорез депротенинизированных нуклеоидов, в ходе которого нити ДНК мигрируют к аноду. Получаемая картина напоминает комету с головой и хвостом. Голова кометы состоит из высокомолекулярной ДНК, хвост — из низкомолекулярной, образовавшейся в результате разрывов ДНК. Полученные «кометы» окрашивают флуоресцентным красителем. Чем выше уровень фрагментации, тем большее количество ДНК при электрофорезе будет располагаться в зоне хвоста кометы [31—34].

К наиболее известным непрямым методам диагностики разрывов ДНК относятся SCD, AO, SCSA, DBD-FISH. При SCD (Sperm Chromatin Dispersion test, Halo Sperm) сперматозоиды обрабатывают вначале раствором кислоты, затем лизирующим буфером, что приводит к удалению большинства ядерных белков. В результате происходит деспирализация ДНК, при этом цельные нити нефрагментированной ДНК демонстрирует массивный, хорошо визуализирующийся ореол дисперсии («halo-эффект») в отличие от фрагментированных цепочек, образующих минимальный ореол. Метод окраски акридином оранжевым (АО, Acridine Orange test) основан на различной чувствительности фрагментированной и интактной ДНК к кислотной денатурации. Высушенные на воздухе мазки эякулята фиксируются в растворе метанол—уксусная кислота и окрашиваются акридином оранжевым (флюорохром). Под воздействием ультрафиолетового излучения флюорохром флуоресцирует зеленым светом, когда он связан с двухцепочечной ДНК, и испускает красную флуоресценцию в сперматозоидах с денатурированной, одноцепочечной ДНК. Исследование SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) сходно с АО, но благодаря применению проточной цитометрии после окрашивания дает лучшие результаты. В ходе теста DBD-FISH (DNA Break Detection-Fluorescence In Situ Hybridization) сперматозоиды вначале обрабатываются щелочным раствором, который разрушает белки и деспирализует ДНК, а затем средой, содержащей флуоресцентномеченые ДНК-зонды. Зонды связываются с одноцепочечной ДНК. Чем выше степень фрагментации ДНК, тем больше образуется одноцепочечных фрагментов и тем выше степень фрагментации [31, 32, 35—37].

Цель настоящего исследования — оценка связи между ИМТ мужчин репродуктивного возраста, параметрами спермограммы, ИФ ДНК сперматозоидов, а также в изучении влияния ИМТ на исходы программ ЭКО и ЭКО/ИКСИ.

Материал и методы

В исследование включен 191 пациент (в возрасте от 25 до 45 лет) из обратившихся в отделение ВРТ ФГБУ ЭНЦ МЗ России за период с апреля 2013 г. по апрель 2014 г. с жалобами на отсутствие наступления беременности в браке при регулярной половой жизни без использования методов контрацепции. Средняя продолжительность бесплодного брака составила $6,1 \pm 3,2$ года [2—15]. Лечение бесплодия проводилось стандартным методом ЭКО, а также у 83 пациентов микрохирургическим методом оплодотворения путем интрацитоплазматической инъекции единичного сперматозоида в цитоплазму ооцита (ИКСИ). Пациенты были разделены на группы в зависимости от ИМТ. Пациенты 1-й группы имели нормальный ИМТ ($18-24,9$ кг/м²), 2-й группы — избыточную массу тела (ИМТ = $25-29,9$ кг/м²), в 3-ю группу — пациенты с ожирением (ИМТ 30 кг/м² и более).

При обследовании у всех пациентов проводили семиологический анализ с оценкой по критериям ВОЗ (2010 г.); оценка морфологии сперматозоидов проводилась по строгим критериям Крюгера на окрашенных стеклах фирмы Cell-uv.

Для определения фрагментации ДНК был использован метод АО в силу его низкой себестоимости, простой техники исполнения, наличия доступного лабораторного оборудования и высокой степени информативности. Исследовали 1,0 мл разжиженного эякулята, который центрифугировали с 9,0 мл физиологического раствора в течение 20 мин при скорости 300 г. Супернатант удаляли, из суспендированного осадка готовили мазок. После высушивания на воздухе в течение 10 мин при комнатной температуре мазок погружали в раствор метанол—уксусная кислота в соотношении 3:1 на 5 мин. Высушенный фиксированный мазок окрашивался АО в течение 3 мин. Затем препарат промывали дистиллированной водой и обезжизивали в течение 1 мин в 70% растворе этанола. После высушивания препарата оценивали ИФ ДНК. Для визуализации сперматозоидов использовался флюоресцентный микроскоп Olympus BX51 с 600-кратным увеличением. Подсчет ИФ ДНК проводился по формуле: число клеток с фрагментированной ДНК, деленное на 100 проанализированных сперматозоидов.

Эффективность лечения бесплодия в программах ЭКО и ЭКО/ИКСИ определяли по частоте наступления клинической беременности (визуализация плодного яйца на 21-й день после переноса эмбриона в полость матки) из расчета на перенос эмбрионов (pregnancy rate, embryo transfer, PR/ET); использовали формулу:

$$\text{PR/ET}(\%) = \frac{\text{Число наступивших беременностей}}{\text{Число переносов эмбрионов}}$$

Определяли также частоту репродуктивных потерь, включающих биохимические беременности (положительный результат анализа крови на β -чХГ без УЗ-визуализации плодного яйца в полости матки), внематочные беременности, самопроизвольное прерывание и замершие беременности (miscarriage rate, MR%). Кроме того, для каждой группы пациентов рассчитывали коэффициент рождения живых здоровых детей — «Take home baby» (ТНВ) — по формуле:

$$\text{ТНВ}(\%) = \frac{\text{Число беременностей, закончившихся рождением живых детей}}{\text{Число клинических беременностей}}$$

Результаты и обсуждение

В 1-ю группу был включен 61 (32%) пациент, во 2-ю группу — 92 (48%) пациента и в 3-ю группу (ожирение) — 38 (20%) (рис. 2).

Средний возраст пациентов по группам составлял $33,2 \pm 4,9$ года (колебания 25—47 лет); $36,0 \pm 5,1$ (24—47) и $35,3 \pm 5,6$ (27—59) года соответственно.

Среди пациентов с нормальным ИМТ нормозооспермия была выявлена у 30 (49,2%) мужчин. Олигоастенотератозооспермию (ОАТ) диагностировали у 12 (19,7%) мужчин. Снижение только концентрации сперматозоидов, или их подвижности, или одновременное ухудшение обоих показателей (олигоспермия/астенозооспермия/олигоастенозооспермия, О/А/ОА) было выявлено у 6 (9,8%) пациентов. Тератозооспермия (Т), характеризующаяся уменьшением числа сперматозоидов с нормальной морфологией, обнаружена у 13 (21,3%) мужчин (рис. 3).

В группе пациентов с избыточной массой тела (2-я группа) нормозооспермия была диагностирована у 49 (53,2%) мужчин; ОАТ, О/А/ОА и Т — у 21, 7 и 15 пациентов (22,8, 7,7 и 16,3% соответственно) (рис. 4).

Среди пациентов с ожирением нормозооспермию выявили у 16 (42,1%) мужчин. ОАТ была диагностирована у 12 пациентов; О/А/ОА и Т — у 4 и 6 мужчин соответственно (31,6, 10,5 и 15,8%) (рис. 5).

После проведения семиологического анализа эякулята всем пациентам было выполнено исследование уровня фрагментации ДНК сперматозоидов методом АО.

Среди пациентов 1-й группы ИФ ДНК сперматозоидов был нормальным (менее 30%) у 21 (34,5%) мужчины и высоким (30% и более) у 40 (65,5%). У 2 (3,3%) пациентов ИФ был менее 15%, у 19 (31,2%) — находился в пределах 15—30%. Среди пациентов этой группы с высоким ИФ у 3 (4,9%) мужчин этот показатель достигал 80,1—100%, у 10 (16,4%) ИФ находился в пределах 50,1—80% и у 27 (44,2%) — в пределах 30,1—50% (рис. 6).

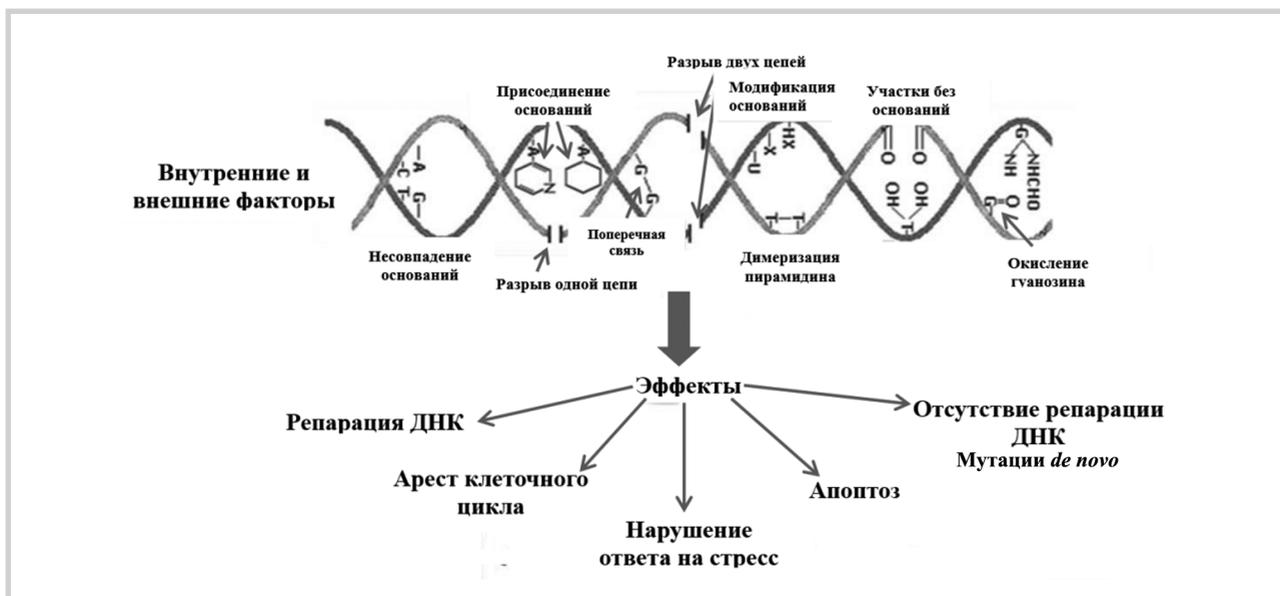


Рис. 1. Основные формы повреждений ДНК [11].

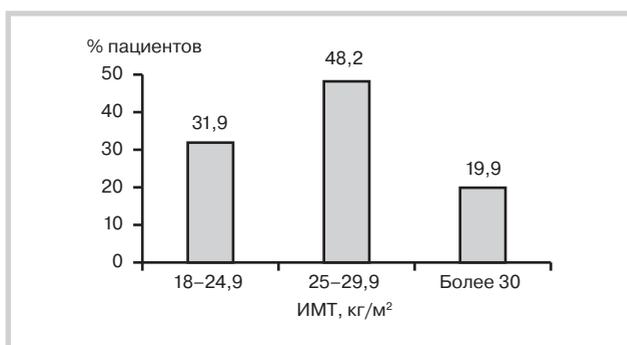


Рис. 2. Распределение пациентов по группам в зависимости от ИМТ.

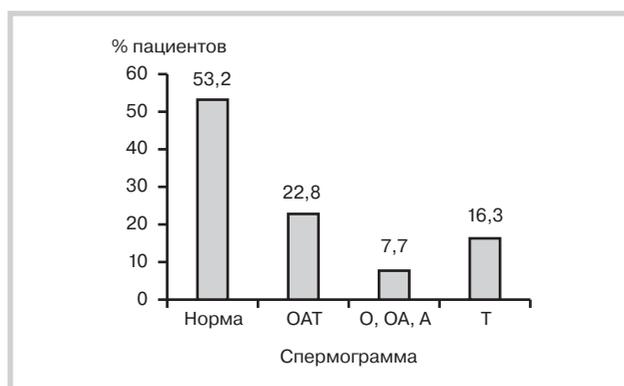


Рис. 4. Распределение пациентов 2-й группы по видам нарушения сперматогенеза.

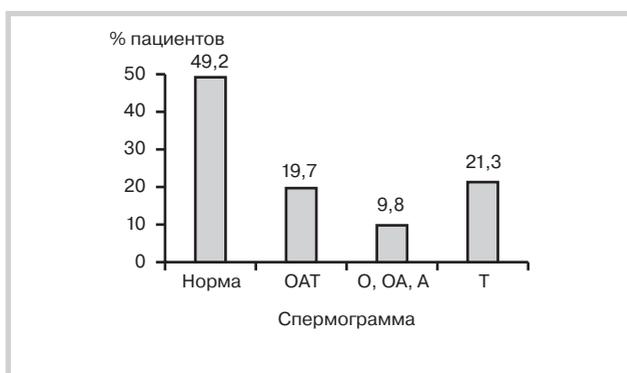


Рис. 3. Распределение пациентов 1-й группы по видам нарушения сперматогенеза.

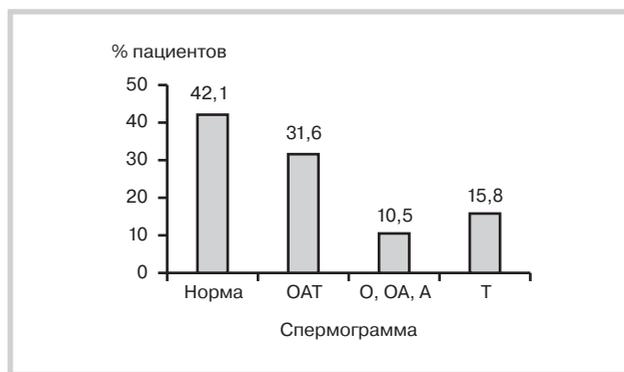


Рис. 5. Распределение пациентов 3-й группы по видам нарушения сперматогенеза.

Во 2-й группе (пациенты с избыточной массой тела) отмечалось уменьшение числа мужчин с ИФ ДНК 30% и менее (26 пациентов, 28,3%); при этом у 66 (71,7%) пациентов показатель повреждения ДНК превышал 30%. ИФ <5% был выявлен у 3 (3,3%)

мужчин этой группы, у 23 (25%) его величина находилась в пределах 15–30%, у 39 (42,4%) — в 30,1–50%, у 22 (23,9%) — в 50,1–80% и у 5 (5,4%) — в 80,1–100% (рис. 7).

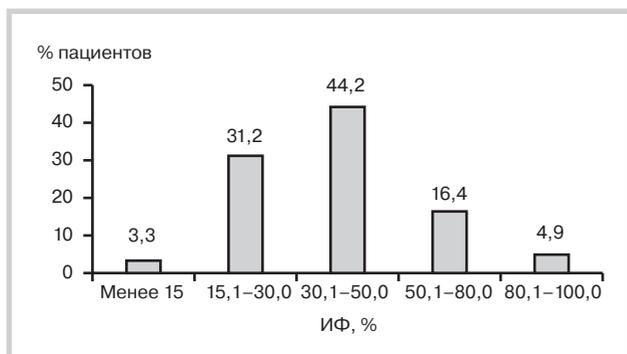


Рис. 6. ИФ ДНК сперматозоидов у пациентов с нормальным ИМТ.

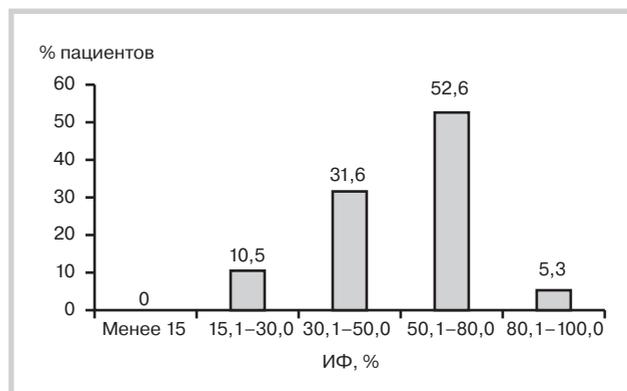


Рис. 8. ИФ ДНК сперматозоидов у пациентов с ожирением.

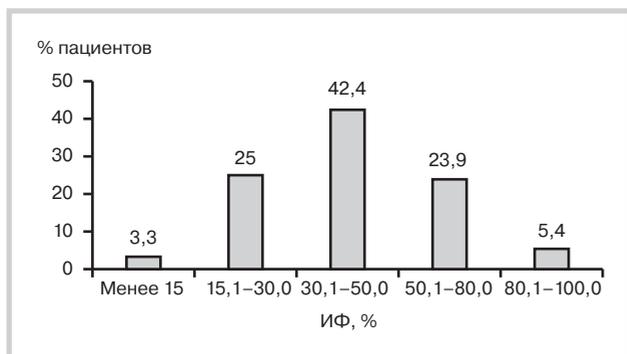


Рис. 7. ИФ ДНК сперматозоидов у пациентов с избыточной массой тела.

В 3-й группе лишь у 4 (10,5%) мужчин показатели повреждения ДНК не превышали 30%; у 34 (89,5%) ИФ ДНК сперматозоидов был высоким. Ни у одного из обследованных этой группы ИФ не был менее 15%. У 4 (10,5%) он находился в пределах 15–30%, у 12 (31,6%) — в 30,1–50%, у 20 (52,6%) — в 50,1–80% и у 2 (5,3%) — в 80,1–100% (рис. 8).

Таким образом, отмечается явная тенденция к увеличению числа мужчин с высоким ИФ ДНК сперматозоидов среди пациентов с избыточной массой тела и ожирением.

Выбор способа оплодотворения (стандартный метод ЭКО или ИКСИ) зависел от параметров эякулята на день проведения пункции фолликулов, количества полученных ооцитов (в случае, если было получено менее 5–7 яйцеклеток, применялось ИКСИ) и предыдущих протоколов ЭКО (если показатели оплодотворения при стандартном ЭКО были 50% и менее, проводили ИКСИ), а также уровня ИФ ДНК сперматозоидов.

В группе пациентов с нормальным ИМТ оплодотворение стандартным методом ЭКО было проведено сперматозоидами 5 (17,9%) пациентов с нормозооспермией, метод ИКСИ был применен у 23 (82,1%). Беременность наступила у 9 пациенток (PR=32,1%) и закончилась родами у 6 (ТНВ=66,7%). У 2 (22,2%) женщин произошло самопроизвольное

прерывание беременности на сроке 5 и 9 нед соответственно; у 1 (11,1%) пациентки была диагностирована замершая беременность на сроке 7 нед. Среди пациенток данной группы ни у одной не было отмечено биохимической и внематочной беременностей. Таким образом, MR составил 33,3%.

В парах, где у партнера имелся избыток массы тела, ЭКО проводили эякулятом 8 (19,5%) пациентов. ИКСИ использовали в 80,5% случаев (33 пациента). Беременность наступила у 15 пациенток (PR=36,6%); у 13 беременность закончилась родами (ТНВ=86,7%). У 2 (13,3%) пациенток была диагностирована замершая беременность на сроке 7 и 8 нед. Биохимическая беременность зарегистрирована у 6 (14,6%) пациенток. В данной группе отсутствовали внематочные беременности и самопроизвольные прерывания беременности. Таким образом, MR составил 27,9%.

В группе пациентов с ожирением ($n=14$) ЭКО было проведено сперматозоидами лишь 1 (7,1%) пациенту с Т, у которого концентрация и подвижность гамет были достаточными. Микрохирургическая техника оплодотворения использовалась в 92,9% случаев (13 пациентов). Беременность наступила у 3 пациенток и у всех закончилась родами (PR=ТНВ=21,4%). Биохимическая беременность регистрировалась у 4 (28,6%) пациенток. Замерших, внематочных и самопроизвольных прерываний не было выявлено ни у одной пациентки. MR составил 28,6%.

Заключение

Проведенное исследование не выявило отчетливого влияния ИМТ мужчины на параметры эякулята: среди пациентов 1-й, 2-й и 3-й групп доля мужчин с различными формами патозооспермии была примерно одинаковой. Однако с увеличением ИМТ отмечается возрастание в эякуляте числа сперматозоидов с фрагментированной ДНК ($r=0,656$): у пациентов 2-й и 3-й группы обнаружено статистиче-

ски значимое увеличение числа сперматозоидов с поврежденной ДНК ($p=0,0159$ и $p=0,03$ соответственно). С увеличением ИМТ партнера отмечалось также снижение частоты наступления клинической беременности; возрастала доля биохимических беременностей и увеличивалась частота репродуктивных потерь. Таким образом, избыточная масса тела и ожирение у мужчин, даже при нормальных показателях спермограммы, является самостоятельным фактором риска бесплодия и неэффективного лечения супружеской пары в программах ЭКО.

Конфликт интересов отсутствует.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Витязева И.И., Трошина Е.А., Алташина М.В.

Сбор и обработка материала — Алташина М.В., Мун Т.В.

Статистическая обработка данных — Витязева И.И., Алташина М.В.

Написание текста — Витязева И.И., Алташина М.В., Мун Т.В., Трошина Е.А.

Редактирование — Витязева И.И., Трошина Е.А.

ЛИТЕРАТУРА

1. Витязева И.И., Алташина М.В., Трошина Е.А. “Влияние нарушений жирового обмена на фертильность мужчин репродуктивного возраста и эффективность программ ЭКО”. // *Проблемы эндокринологии*. 2014;60:5:34-42. [Vityazeva II, Altashina MV, Troshina EA. The influence of disordered fat metabolism on male fertility at the reproductive age and the effectiveness of the ECF programs. *Probl Endokrinol (Mosk)*. 2014;60(5):34-42. (In Russ.)]. doi: 10.14341/probl201460534-42.
2. Божедомов В.А., Громенко Д.С., Ушакова И.В. и др. “Причины оксидативного стресса сперматозоидов”. // *Проблемы репродукции*. 2008;6:67-73. [Bozhedomov VA, Gromenko DS, Ushakova IV, et al. Prichiny oksidativnogo stressa spermatozoidov. *Problemy reproduksii*. 2008;(6):67-73. (In Russ.)].
3. Брагина Е.Е., Замятнина В.А., Бочарова Е.Н., и др. “Количественное ультраструктурное исследование хроматина сперматозоидов при нарушении фертильности”. // *Андрология и генитальная хирургия*. 2009;1:44-49. [Bragina EE, Zamyatnina VA, Bocharova EN, et al. Quantitative ultrastructural research of spermatozoon from patients with fertility infringement. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya*. 2009;(1):44-49. (In Russ.)].
4. Singh K, Jaiswal D. Human male infertility: a complex multifactorial phenotype. *Reprod Sci*. 2011;18(5):418-425. doi: 10.1177/1933719111398148.
5. Cabler S, Agarwal A, Flint M, du Plessis SS. Obesity: modern man's fertility nemesis. *Asian J Androl*. 2010;12(4):480-489. doi: 10.1038/aja.2010.38.
6. Sallmén M, Sandler DP, Hoppin JA, et al. Reduced Fertility Among Overweight and Obese Men. *Epidemiology*. 2006;17(5):520-523. doi: 10.1097/01.ede.0000229953.76862.e5.
7. Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*. 2012;2(4):253-263. doi: 10.4161/spmg.21362.
8. Sunderam S, Chang J, Flowers L, et al. *Assisted reproductive technology surveillance—United States, 2006*: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. 2009.
9. Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil*. 2014;15(1):2-14. PMID: 24696791.
10. Боголюбов С.В., Витязева И.И., Макарова Н.П., Львова А.Г. “Клиническое ведение пациентов с тератозооспермией в циклах вспомогательных репродуктивных технологий”. // *Доктор.Ру*. 2009;6:34-38. [Bogolyubov SV, Vityazeva II, Makarova NP, L'vova AG. Klinicheskoe vedenie patientsov s teratozoospermiey v tsiklakh vspomogatel'nykh reproduktivnykh tekhnologiy. *Doktor.Ru*. 2009;(6):34-38. (In Russ.)].
11. Gonzalez-Marin C, Gosalvez J, Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci*. 2012;13(11):14026-14052. doi: 10.3390/ijms13114026.
12. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril*. 2002;77(5):873-882. PMID: 12009338.
13. Niederberger C. *WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male*. Elsevier. 2001.
14. Kashir J, Jones C, Lee HC, et al. Loss of activity mutations in phospholipase C zeta (PLCzeta) abolishes calcium oscillatory ability of human recombinant protein in mouse oocytes. *Hum Reprod*. 2011;26(12):3372-3387. doi: 10.1093/humrep/der336.
15. Брагина Е.Е., Замятнина В.А., Гаврилов Ю.А., и др. “Упаковка хроматина и фрагментация ДНК: два типа нарушений наследственного материала сперматозоидов”. // *Медицинская генетика*. 2009;8:10:29-35. [Bragina EE, Zamyatnina VA, Gavrilov JA, et al. Chromatin Packing and DNA fragmentation: Two types of infringements of a sperm hereditary material. *Meditsinskaya genetika*. 2009;8(10):29-35. (In Russ.)].
16. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *J Androl*. 2002;23(1):25-43. doi: 10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x.
17. Evenson DP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999;14(4):1039-1049. doi: 10.1093/humrep/14.4.1039.
18. Spanò M, Bonde JP, Højllund HI, et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril*. 2000;73(1):43-50. doi: 10.1016/s0015-0282(99)00462-8.
19. Светлаков А.В., Шеина Ю.И., Еремеев А.В., Серебренникова О.А. “Анализ фрагментации ДНК сперматозоидов, как независимый критерий качества эякулята в практике Красноярского центра репродуктивной медицины”. // *Андрология и генитальная хирургия*. 2011;2:126. [Svetlakov AV, Sheina YI, Eremeev AV, Serebrennikova OA. Analiz fragmentatsii DNK spermatozoidov, kak nezavisimyy kriteriy kachestva eyakulyata v praktike Krasnoyarskogo tsentra reproduktivnoy meditsiny. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya*. 2011;(2):126. (In Russ.)].
20. Dupont C, Faure C, Sermondade N, et al. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl*. 2013;15(5):622-625.

- doi: 10.1038/aja.2013.65.
21. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect.* 2000;108(10):961-966. PMID: 11049816.
 22. Дедов И.И., Мельниченко Г.А. (ред.). «Эндокринология. Национальное руководство». М.: ГЭОТАР-Медиа. 2009;475. [Dedov II, Mel'nichenko GA, (eds). *Endocrinology. National guidelines.* Moscow: GEOTAR-Media. 2009. (In Russ.)].
 23. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;250(1-2):66-69. doi: 10.1016/j.mce.2005.12.026.
 24. Shamsi MB, Kumar R, Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res.* 2008;127(2):115-123. PMID: 18403788.
 25. Practice Committee of the American Society for Reproductive M. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil Steril.* 2013;99(3):673-677. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.049.
 26. Zini A, Meriano J, Kader K, et al. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum Reprod.* 2005;20(12):3476-3480. doi: 10.1093/humrep/dei266.
 27. Dupont C, Faure C, Sermondade N, et al. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl.* 2013;15(5):622-625. doi: 10.1038/aja.2013.65.
 28. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, et al. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int.* 2012;110(6):863-867. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10813.x.
 29. MacDonald AA, Stewart AW, Farquhar CM. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones in New Zealand men: a cross-sectional study in fertility clinics. *Hum Reprod.* 2013;28(12):3178-3187. doi: 10.1093/humrep/det379.
 30. Hultman CM, Sandin S, Levine SZ, et al. Advancing paternal age and risk of autism: new evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies. *Mol Psychiatry.* 2010;16(12):1203-1212. doi: 10.1038/mp.2010.121.
 31. Agarwal A, Damer M. Sperm chromatin assessment. *Textbook of assisted reproduction techniques.* Taylor & Francis Group (London). 2004.
 32. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, et al. Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. *J Androl.* 2006;27(1):53-59. doi: 10.2164/jandrol.05068.
 33. Muriel L. Structure of human sperm DNA and background damage, analysed by in situ enzymatic treatment and digital image analysis. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(3):203-209. doi: 10.1093/molehr/gah029.
 34. Rivero MT, Vazquez-Gundin F, Muriel L, et al. Patterns of DNA migration in two-dimensional single-cell gel electrophoresis analyzed by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization. *Environ Mol Mutagen.* 2003;42(3):223-227. doi: 10.1002/em.10187.
 35. Шеина 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;5:74-79. [Sheina II, Zaitseva TA, Makhalova NA, et al. The analysis of sperm DNA fragmentation in infertility patients with the help of acridine orange staining. *Problemy reproduksii.* 2012;(5):74-79. (In Russ.)].
 36. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, et al. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 2000;15(8):1717-1722. doi: 10.1093/humrep/15.8.1717.
 37. Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Rivero MT, et al. DBD-FISH on Neutral Comets: Simultaneous Analysis of DNA Single- and Double-Strand Breaks in Individual Cells. *Exp Cell Res.* 2001;270(1):102-109. doi: 10.1006/excr.2001.5328.