

... ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS ...

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-11
УДК: 573.6:577.21-076

Вплив підвищеного рівня активних форм кисню в еякуляті на показники репродуктивної функції у чоловіків зі зниженням фертильності О.М. Феськов, Є.С. Жилкова, І.А. Феськова, Г.В. Іванова, О.В. Блажко

Високий рівень активних форм кисню (АФК) в еякуляті є однією з причин зниження чоловічої репродуктивної функції. Окислювальний стрес визначається як дисбаланс між утворенням активних форм кисню та здатністю антиоксидантної системи їх детоксикувати. Надлишок активних форм кисню в спермі може ініціювати патологічні зміни сперматозоїдів, викликаючи окисне пошкодження клітинних оболонок, білків і ДНК. Вимірюванню вмісту активних форм кисню перешкоджає відсутність стандартизації. У даному дослідженні визначено вплив окислявального стресу на стандартні мікроскопічні параметри спермограми та рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті у чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією. Отримані результати підтверджують значну роль роботи системи детоксикації у підтримці нормальних мікроскопічних показників спермограми. Встановлено негативний вплив високого рівня активних форм кисню в еякуляті на рухливість, концентрацію та морфологію сперматозоїдів у чоловіків з порушенням фертильності ($p < 0,05$). Показано, що рівень окислявального стресу в еякуляті статистично значуще вищий у пацієнтів зі зниженими параметрами спермограми, у порівнянні з даним показником для чоловіків з нормальними показниками репродуктивної функції ($p < 0,01$). Не виявлено впливу віку чоловіків на мікроскопічні показники еякуляту. Кореляції між рівнем активних форм кисню та часткою сперматозоїдів з фрагментованою ДНК в еякуляті не встановлено. Втім показано, що частка сперматозоїдів з фрагментованою ДНК значно вища у безплідних пацієнтів у порівнянні з групою чоловіків з нормальними показниками репродуктивної функції ($p < 0,05$). Отже, високий рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті також можна вважати однією з причин зниження чоловічої фертильності. Доведено доцільність визначення рівня окислявального стресу у чоловіків зі зниженими параметрами спермограми у рамках обстеження з метою встановлення причин безпліддя у парі. Надалі необхідно стандартизувати правила забору матеріала та виконання аналізу визначення рівня активних форм кисню в еякуляті.

Ключові слова: активні форми кисню, окислявальний стрес, чоловіче безпліддя, репродуктивна функція, фрагментація ДНК

Цитування: Феськов О.М., Жилкова Є.С., Феськова І.А., Іванова Г.В., Блажко О.В. Вплив підвищеного рівня активних форм кисню в еякуляті на показники репродуктивної функції у чоловіків зі зниженням фертильності. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія», 2024, 43, с. 132-137. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-11>

Про авторів:

О.М. Феськов - Центр Репродукції Людини (Клініка професора Феськова О.М.), 61098, м. Харків, вул. Холодногірська, 15, fmad@feskov.ua, <https://orcid.org/0000-0003-3626-0229>
Є.С. Жилкова - Центр Репродукції Людини (Клініка професора Феськова О.М.), 61098, м. Харків, вул. Холодногірська, 15, zhilkova@feskov.ua, <https://orcid.org/0000-0002-5706-3577>
І.А. Феськова - Центр Репродукції Людини (Клініка професора Феськова О.М.), 61098, м. Харків, вул. Холодногірська, 15, fiadivf@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6268-5178>
Г.В. Іванова - Центр Репродукції Людини (Клініка професора Феськова О.М.), 61098, м. Харків, вул. Холодногірська, 15, ivanova@feskov.ua, <https://orcid.org/0009-0000-5994-3183>
О.В. Блажко - Центр Репродукції Людини (Клініка професора Феськова О.М.), 61098, м. Харків, вул. Холодногірська, 15, blazhko@feskov.ua, <https://orcid.org/0000-0001-5048-7273>

Подано до редакції: 23.12.2023 / Прорецензовано: 31.09.2024 / Прийнято до друку: 19.11.2024

Вступ

За даними літератури, у країнах Європи і в Україні чоловіче безпліддя є причиною ненастання вагітності у подружжі більше, ніж у 50% випадків (Mazzilli, 2023). Наразі ряд наукових досліджень свідчить про те, що високий рівень активних форм кисню (АФК) в еякуляті є однією з причин зниження

чоловічої репродуктивної функції. Активні форми кисню – це необхідна умова для дозрівання, існування та здатності сперматозоїдів запліднювати ооцит (Amanda, 2022; Wagner, 2018). Вміст АФК на оптимальному рівні підтримується антиоксидантною системою. Окислювальний стрес визначається як дисбаланс між утворенням активних форм кисню та здатністю антиоксидантної системи їх детоксикації. З іншого боку, вимірюванню вмісту активних форм кисню перешкоджає відсутність стандартизації, включаючи вибір контролів і відбір зразків (Latchoumycandane, 2020). Літературні дані щодо впливу оксидативного стресу на стандартні показники фертильності (рухливість, кількість та морфологія сперматозоїдів) та на цілісність ДНК сперматозоїдів в еякуляті неоднозначні. Більшість робіт свідчить про те, що надлишок активних форми кисню в спермі може ініціювати патологічні зміни сперматозоїдів, викликаючи окисне пошкодження клітинних оболонок, білків і ДНК. З іншого боку у ряді досліджень не доведено вплив оксидативного стресу на цілісність ДНК (фрагментацію ДНК) сперматозоїдів (O'Flaherty, 2020). Метою даної роботи було визначити вплив оксидативного стресу на стандартні мікроскопічні параметри спермограми та рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті у чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією.

Об'єкт та методи дослідження

Збір первинної інформації та лабораторні дослідження проводили в «Клініці професора Феськова О.М.» (м. Харків). Проведення даного дослідження ухвалено Етичним комітетом ТОВ «Сана-Мед» (Центра репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.») відповідно до протоколу № 3 від 01 квітня 2023 року. За період квітень-вересень 2023 року було сформовано групу з 42 пацієнтів з нормальним чоловічим каріотипом 46,XY з порушенням фертильності (Група 1). Середній вік пацієнтів у Групі 1 становив 35,2±4,3 років. До групи контролю увійшли 25 чоловіків середнім віком 36,2±2,6 років з показниками параметрів спермограми у межах норми (Група 2). Проведений мікроскопічний аналіз еякуляту, досліджено рівень активних форм кисню та рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів у Групах 1 та 2.

Аналіз еякуляту проведено за допомогою спермограми. Під час дослідження визначалися кількісні, якісні та морфологічні параметри еякуляту. Показники сперми оцінювалися за критеріями ВООЗ 2010 року (World Health Organization, 2010).

Визначення рівня фрагментації ДНК сперми проводилося методом дисперсії хроматину сперматозоїдів (SCD, sperm chromatin dispersion). Дослідження проведено з використанням комерційних наборів для визначення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті Halosperm G2 (Halotech DNA, Іспанія). Відповідно до рекомендацій Європейської Асоціації Урологів, рівень фрагментації ДНК у спермі не повинен перевищувати 20 % (Okubo, 2023).

Рівень оксидативного стресу в еякуляті проаналізовано за допомогою наборів Oxisperm (Halotech DNA, Іспанія). Аналіз базується на здатності нітросинього тетразолію та інших молекул, пов'язаних з окислювальним стресом, перетворюватися під дією супероксид-аніонів на нерозчинний у воді синій кристал формазан, що змінює інтенсивність кольору у реактивному гелі (від жовтого до різних рівнів фіолетово-синього). Результат аналізу визначався за кольоровою школою за інтенсивністю забарвлення. Згідно з градацією виробника, було виділено 4 рівні оксидативного стресу (рівні 1 та 2 – це низький вплив АФК; рівень 3 – середній вплив АФК; рівень 4 – високий вплив АФК) (Castleton, 2022).

Аналіз каріотипу пацієнтів виконаний із застосуванням цитогенетичних методів. Культивування лімфоцитів проводилося з використанням середовища для культивування PB MAX Karyotyping (Gibco) протягом 72 годин при рівні CO₂ 5,5–6 % та за температурою 36,9°C. Фарбування цитогенетичних препаратів здійснювалося за допомогою GTG (G-метод) та CBG (C-метод) методів. Аналіз проведено з використанням Міжнародної цитогенетичної номенклатури (International System for Cytogenetic Nomenclature, ISCN) (Shaffer, 2009).

Перевірку розподілу кількісних даних на відповідність закону нормального розподілу виконали з використанням методів Шапіро-Уїлка та Колмогорова-Смірнова. Порівняння середніх арифметичних проводили за допомогою критерію Стьюдента. Для дослідження зв'язків між ознаками використали метод кореляційного аналізу за Спірменом. Статистичні гіпотези перевіряли за допомогою критеріїв t , r_s за рівнів значущості 0,05 та 0,01 (Атраментова, 2007).

Результати та обговорення

Під час дослідження було встановлено негативний вплив високого рівня активних форм кисню в еякуляті на рухливість, концентрацію та морфологію сперматозоїдів у чоловіків з порушенням фертильності. Отримані результати наведені у таблиці 1. Принцип визначення рівня АФК (оксидативного стресу) в еякуляті схематично наведений на рис. 1.

Таблиця 1. Зв'язок рівня активних форм кисню в еякуляті з класичними параметрами спермограми у чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією

Table 1. The correlation between the level of reactive oxygen species in the ejaculate and the classical parameters of the spermogram in men with low reproductive function

Параметр спермограми		Кількість чоловіків, N	Середній рівень оксидативного стресу	r_s	$R_{кр}$	p
Найменування	Середнє значення, $\bar{X} \pm m_x$					
Рухливість, %	50,6±14,1	42	3,1±0,9	-0,45	0,329	$p < 0,05$
Концентрація, млн./мл	55,8±30,7	42	3,1±0,9	-0,42	0,329	$p < 0,05$
Морфологія, %	14,2±10,9	42	3,1±0,9	-0,44	0,329	$p < 0,05$

Примітка: p – рівень значущості, r_s — коефіцієнт кореляції Спірмена

Notes: p – significance level, r_s — Spearman coefficient

Не було виявлено впливу віку чоловіків на мікроскопічні показники еякуляту. Статистично значущої кореляції між рівнем активних форм кисню та часткою сперматозоїдів з фрагментованою ДНК в еякуляті не встановлено у групі пацієнтів зі зниженими показниками фертильності ($p > 0,05$). Фото сперматозоїдів з нормальною та пошкодженою ДНК наведено на рис. 2. Відсутність статистично значущої кореляції між рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів та рівнем АФК в еякуляті у розглянутій групі чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією підтверджує дані, отримані рядом авторів щодо відсутності впливу оксидативного стресу на цілісність ДНК сперматозоїдів в еякуляті (Agarwal, 2017; Steiner, 2020). Було встановлено, що рівень оксидативного стресу в еякуляті статистично значущо вищий у пацієнтів Групи 1, порівнюючи з даним показником для чоловіків у контрольній групі (2,4±0,8 проти 1,6±0,6; $t_{емп.} = 3,3$, $t_{крит.} = 2,797$ $p < 0,01$, відповідно).

Не виявлено кореляції між рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів та параметрами спермограми у чоловіків зі зниженням репродуктивної функції (табл. 2). Втім середній рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті був значно вищий у групі пацієнтів зі зниженням фертильності у порівнянні з групою контролю (18,6±12,5 % проти 5,5±2,1 %, $p < 0,05$, відповідно).

Таблиця 2. Зв'язок рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті з класичними параметрами спермограми у чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією

Table 2. The correlation between the level of sperm DNA fragmentation in the ejaculate and the classical parameters of the spermogram in men with low reproductive function

Параметр спермограми		Кількість чоловіків, N	Середній рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів, %	r_s	$R_{кр}$	p
Найменування	Середнє значення, $\bar{X} \pm m_x$					
Рухливість, %	50,6±14,1	42	18,6±12,5	-0,14	0,329	$p > 0,05$
Концентрація, млн./мл	55,8±30,7	42	18,6±12,5	-0,24	0,329	$p > 0,05$
Морфологія, %	14,2±10,9	42	18,6±12,5	-0,27	0,329	$p > 0,05$

Примітка: p – рівень значущості, r_s — коефіцієнт кореляції Спірмена

Notes: p – significance level, r_s — Spearman coefficient

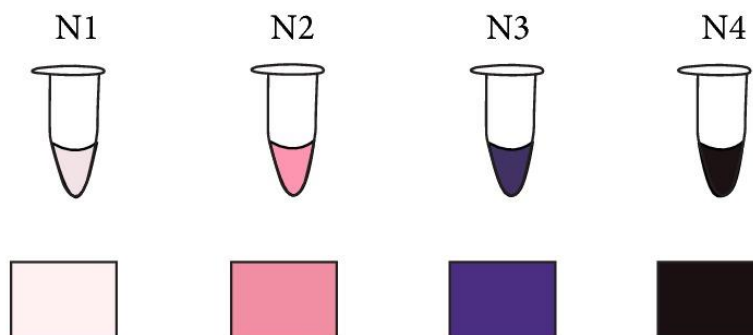


Рис. 1. Схема визначення рівня оксидативного стресу в еякуляті за допомогою наборів Oxisperm (Halotech DNA, Іспанія): N1, N2 – низький вплив АФК; N3 – середній вплив АФК; N4 - високий вплив АФК
Fig. 1. Scheme for determining the level of oxidative stress in the eculeate using Oxisperm kits (Halotech DNA, Spain): N1, N2 – low exposure to ROS; N3 – average exposure to ROS; N4 - high exposure to ROS

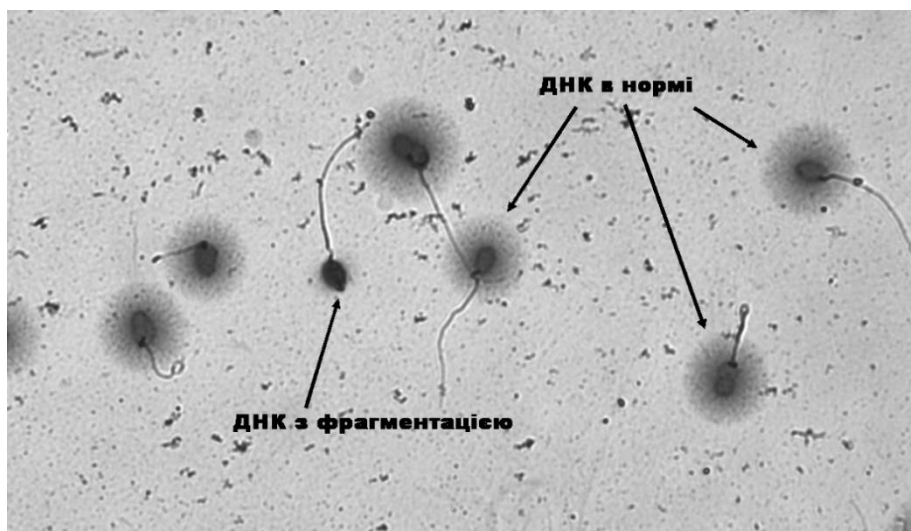


Рис. 2. Дослідження рівня фрагментації ДНК у сперматозоїдах методом дисперсії хроматину, метод фазового контрасту. Збільшення x400
Fig. 2. Investigation of the level of DNA fragmentation in spermatozoa by the method of chromatin dispersion, the phase contrast method. Magnification x400

Оксидативний стрес є одним з факторів зниження репродуктивної функції у чоловіків (Aitken, 2013; Aitken, 2016; Asadi, 2017). Дане дослідження показало, що підвищений рівень активних форм кисню в еякуляті негативно впливає на рухливість, концентрацію, та морфологічні властивості сперматозоїдів. Отримані у даній роботі результати підтверджують значну роль системи детоксикації у підтримці нормальних мікроскопічних показників спермограми (Benkhalifa, 2014; Bisht, 2017). Наразі не було виявлено кореляції між рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів та високим рівнем АФК у розглянутій групі пацієнтів зі зниженням фертильності. Втім було показано, що частка сперматозоїдів з фрагментованою ДНК значно вища у безплідних пацієнтів у порівнянні з групою чоловіків з нормальними показниками репродуктивної функції. А отже, високий рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті також можна вважати однією з причин зниження чоловічої фертильності.

Доведено, що підвищений рівень активних форм кисню в еякуляті веде до зниження рухливості, кількості та до порушення морфології сперматозоїдів. Показано, що частка сперматозоїдів з фрагментованою ДНК статистично вища у пацієнтів з порушенням фертильності у порівнянні з чоловіками з нормальними показниками репродуктивної функції. Визначення рівня оксидативного стресу в еякуляті може бути доцільним у чоловіків зі знизеними параметрами спермограми для визначення можливої причини зниження показників фертильності.

Список використаних джерел/References

- Атраментова, Л.О., Утевська, О.М. (2007) Статистичні методи в біології: підруч. для студ. біол. спец. вищих навч. закладів. Харків, 286 с. [Atramentova L.A., Utevska O.M. (2008). Statistical methods in biology. Gorlovka: Likhtar. 248 p.]
- World Health Organization. (2010) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen / World Health Organization, 5th ed. Geneva, 2010. 286 pp.
- Wagner, H., Cheng, J., Ko, Edmund Y. (2018) Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. Arab J Urol., 16(1): 35–43. DOI: 10.1016/j.aju.2017.11.001
- Steiner, A. Z., Hansen, K. R., Barnhart, K. T., Cedars, M. I., Legro, R. S., Diamond, M. P., et al. (2020). The Effect of Antioxidants on Male Factor Infertility: the Males, Antioxidants, and Infertility (MOXI) Randomized Clinical Trial. Fertil. Sterility 113 (3), 552–560. e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.11.008
- Shaffer, K.G., Slovak, M.L., Campbell, L.J. (2009) ISCN 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature . Basel: Karger, 138 p.
- Okubo, T., Onda, N., Hayashi, T. et al. (2023) Performing a sperm DNA fragmentation test in addition to semen examination based on the WHO criteria can be a more accurate diagnosis of IVF outcomes. BMC Urology, 23: 78. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12894-023-01257-y>
- Mazzilli, R., Rucci, C., Vaiarelli, A. et al. (2023) Male factor infertility and assisted reproductive technologies: indications, minimum access criteria and outcomes. J Endocrinol Invest., 46(6): 1079–1085. DOI: 10.1007/s40618-022-02000-4
- Latchoumycandane, C, Vaithinathan, S, D'Cruz, S, Mathur, P.P. Apoptosis and male infertility. In: Parekattil S.J., Esteves S.C., Agarwal A., editors. Male infertility. Switzerland: Springer; 2020: 479–486.
- O'Flaherty, Ch. (2020) Reactive Oxygen Species and Male Fertility. Antioxidants, 9(4), 287; <https://doi.org/10.3390/antiox9040287>
- Castleton, P.E., Deluao, J.C., Sharkey, D.J., McPherson, N. (2022) Antioxidants (Basel), 28;11(2):264. doi: 10.3390/antiox11020264.
- Bisht, S., Dada, R. (2017). Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventative strategies. Frontiers in Bioscience (Schol Ed), 9: 420–447.
- Benkhalifa, M., Ferreira, Y., Chahine, H., Louanjli, N., Miron, P., Merviel, P., Copin, H. (2014). Mitochondria: Participation to infertility as source of energy and cause of senescence. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 55: 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.08.011>
- Asadi, N., Bahmani, M., Kheradmand, A., Rafieian-Kopaei, M. (2017). The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it: A review. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 11, IE01–IE05.
- Amanda, M., Argento, F.R., Fins, E. et al. (2022) The Impact of Oxidative Stress in Male Infertility. Sec. Molecular Diagnostics and Therapeutics, 8: DOI <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.799294>
- Aitken, R., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J., Gharagozloo, P. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. Reproduction and Fertility Development, 28, 1–10. <https://doi.org/10.1071/RD15325>
- Aitken, R. J., Baker, M. A. (2013). Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. International Journal of Developmental Biology, 57, 265–272. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130146ja>
- Agarwal, A., Cho, C., Esteves, S., Majzoub, A. (2017). Reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. Translational Andrology and Urology, 6 (4), S691-4. doi: 10.21037/tau.2017.05.40.

The effect of increased levels of reactive oxygen species in ejaculate on parameters of reproductive function in men with low fertility

O. Feskov, Ye. Zhyilkova, I. Feskova, H. Ivanova, O. Blazhko

A high level of reactive oxygen species (ROS) in the ejaculate is one of the reasons for the failure in male reproductive function. Oxidative stress is defined as an imbalance between the formation of reactive oxygen species and the ability of the antioxidant system to detoxify them. An excess of reactive oxygen species in sperm can initiate pathological changes in spermatozoa, causing oxidative damage to cell membranes, proteins and DNA. Measurement of the content of reactive oxygen species is hindered by the lack of standardization. This study determined the effect of oxidative stress on standard microscopic parameters of the spermogram and the DNA fragmentation level of spermatozoa in the ejaculate of men with reduced reproductive function. The obtained results confirm the significant role of the detoxification system in maintaining normal microscopic parameters of the spermogram. A negative effect of a high level of reactive oxygen species in the ejaculate on the sperm motility, concentration and morphology of spermatozoa

in men with reduced fertility was established ($p < 0.05$). It is shown that the level of oxidative stress in the ejaculate is statistically significantly higher in patients with reduced parameters of the spermogram, compared with this indicator for men with normal indicators of reproductive function ($p < 0.01$). No influence of men's age on microscopic indicators of ejaculate was found. No correlation was established between the level of reactive oxygen species and the percentage of spermatozoa with fragmented DNA in the ejaculate. However, it was shown that the proportion of spermatozoa with fragmented DNA is significantly higher in infertile patients compared to the group of men with normal reproductive function ($p < 0.05$). Therefore, a high level of sperm DNA fragmentation in the ejaculate can also be considered as one of the reasons for the decline in male fertility. The necessity of determining the level of oxidative stress in men with reduced spermogram parameters as part of an examination to find out the causes of infertility in a couple has been proven. In the future, it is necessary to standardize the rules for taking the material and performing the analysis for determining the level of reactive oxygen species in the ejaculate.

Key words: *reactive oxygen species, oxidative stress, male infertility, reproductive function, DNA fragmentation*

Cite this article: Feskov O., Zhylkova Ye., Feskova I., Ivanova G., Blazhko O. (2024). The effect of increased levels of reactive oxygen species in ejaculate on parameters of reproductive function in men with low fertility. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology*, 43, p. 132-137. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-11> (in Ukrainian)

About the authors:

O. Feskov - Centre of Human Reproduction "Clinic of Professor Feskov O.M.", 61098 Kharkiv, Kholodnohirska str. 15, fmad@feskov.ua , <https://orcid.org/0000-0003-3626-0229>

Ye. Zhylkova - Centre of Human Reproduction "Clinic of Professor Feskov O.M.", 61098 Kharkiv, Kholodnohirska str. 15, zhilkova@feskov.ua , <https://orcid.org/0000-0002-5706-3577>

I. Feskova - Centre of Human Reproduction "Clinic of Professor Feskov O.M.", 61098 Kharkiv, Kholodnohirska str. 15, fiadivf@gmail.com , <https://orcid.org/0000-0002-6268-5178>

G. Ivanova - Centre of Human Reproduction "Clinic of Professor Feskov O.M.", 61098 Kharkiv, Kholodnohirska str. 15, ivanova@feskov.ua , <https://orcid.org/0009-0000-5994-3183>

O. Blazhko - Centre of Human Reproduction "Clinic of Professor Feskov O.M.", 61098 Kharkiv, Kholodnohirska str. 15, blazhko@feskov.ua , <https://orcid.org/0000-0001-5048-7273>

Received: 23.12.2023 / Revised: 31.09.2024 / Accepted: 19.11.2024