

Оксидативный стресс в развитии необструктивной азооспермии

Н.Г.Кульченко

Российский университет дружбы народов,
Москва

Рост частоты мужского фактора бесплодия может достигать 20–40% и связан с увеличением частоты воспалительных заболеваний половых органов у мужчин, ростом аномалий развития, влиянием вредных факторов внешней среды. Цель исследования: выявить дополнительные звенья патогенеза идиопатического мужского бесплодия. Материал и методы: было обследовано 24 (54,5%) мужчин с идиопатической необструктивной азооспермией. Группу сравнения составили 20 (45,5%) здоровых добровольцев мужского пола. С целью выявления дополнительных звеньев патогенеза патоспермии определялась функциональная активность лейкоцитов периферической крови пациентов. Результаты: у пациентов с необструктивной азооспермией достоверно больше общее количество и скорость продукции активных форм кислорода лейкоцитами за выбранный интервал времени, по сравнению со здоровыми мужчинами ($p < 0,05$). Гистологическое исследование яичка также выявило признаки воспаления, что привело к нарушению сперматогенеза. Выводы: одной из причин необструктивной азооспермии является хроническое воспаление, которое вызывает оксидативный стресс.

Ключевые слова: активность лейкоцитов, идиопатическое необструктивное мужское бесплодие, оксидативный стресс.

Oxidative stress in the development of non-obstructive azoospermia

N.G.Kulchenko

RUDN University, Moscow

The growth rate of male factor infertility can reach 20–40% and is associated with increased frequency of inflammatory diseases of the genital organs in men, an increase in congenital malformations, and the influence of harmful environmental factors. Research objectives: To identify additional links in the pathogenesis of idiopathic male infertility. Materials and methods: 24 (54.5%) men with idiopathic non-obstructive azoospermia were examined. The comparison group consisted of 20 (45.5%) healthy male volunteers. The functional activity of peripheral blood leukocytes in patients was determined in order to identify additional links of pathospermia pathogenesis. Results: The total number and rate of production of reactive oxygen species by leukocytes was significantly higher for a selected time interval in patients with nonobstructive azoospermia than in healthy men ($p < 0.05$). Histological examination of the testicle has also revealed signs of inflamma-

tion, leading to a disruption of spermatogenesis. Conclusion: One of the reasons of non-obstructive azoospermia is chronic inflammation, which causes oxidative stress.

Keywords: leukocyte activity, idiopathic non-obstructive male infertility, oxidative stress.

В настоящее время около 15 % супружеских пар в мире не могут достичь беременности в течение 1 года и обращаются за медицинской помощью к врачам разных специальностей [3, 8]. Рост частоты мужского фактора бесплодия достигает 20–40% и связан с увеличением частоты воспалительных заболеваний половых органов у мужчин, ростом аномалий развития, влиянием вредных факторов внешней среды, аллергизацией населения [1, 2, 5, 7–9]. Но в 25% случаев из числа всех обследованных мужчин, причина мужского бесплодия бывает не установлена, что расценивается специалистами как идиопатическая форма бесплодия, которая наиболее тяжело поддается лечению потому, что терапия подбирается эмпирическим путем [3, 4, 6].

Цель исследования: выявить дополнительные звенья патогенеза идиопатического мужского бесплодия.

Материал и методы

Было обследовано 44 человека в возрасте от 18 до 46 (32+14) лет. Из них 24 (54,5%) мужчины были с жалобами на отсутствие беременности у супруги более 12 мес, которые составили первую группу исследования. Во вторую группу исследования было включено 20 (45,5%) здоровых добровольцев мужского пола.

Критериями включения пациентов в исследование были: возраст пациентов до 46 лет, установленный факт бесплодия без контрацепции, отсутствие патологии со стороны половой партнерши, отсутствие в анамнезе двусторонних поражений яичек, отсутствие гипоплазии яичек с двух сторон.

В исследование не включали пациентов с obstructивной формой бесплодия, с заболеваниями передающимися половым путем, с варикоцеле, с выявленными генетическими и эндокринными факторами бесплодия, с тяжелой сопутствующей патологией на момент обследования.

В объем обязательного клинического исследования всех пациентов входили: сбор анамнеза, стандартные клинико-лабораторные методы, определение гормонального профиля, двукратное исследование эякулята, методом MAR определяли процент сперматозоидов, покрытых атиспермальными антителами, ультразвуковое исследование (УЗИ) предстательной железы, органов мошонки.

С целью выявления дополнительных звеньев патогенеза патоспермии определялась функциональная активность лейкоцитов периферической крови пациентов. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (20 ЕД/мл крови). Для осаждения эритроцитов кровь смешивали с 6% декстрана на фосфатно-солевом буфере (2,7 мМ КСl, 136,7 мМ NaCl, 1,5 мМ KH_2PO_4 , 8,1 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,4) в соотношении 1 к 4 (1 объем декстрана + 4 объема крови) и отстаивали 10 мин при 37°C + 30 мин при комнатной температуре. Плазму крови со взвешенными в ней лейкоцитами отбирали шприцем с длинной иглой в чистую пробирку и центрифугировали при 400 g (1000 об/мин) в течение 10 мин. Супернатант декантировали, а полученный клеточный осадок дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4). Ко-

Интенсивность и светосумма ХЛ лейкоцитов		
Группы пациентов	Интенсивность (амплитуда) ХЛ, отн. ед.	Светосумма ХЛ, отн. ед.*с
Основная группа	40,3±0,5	56463,43±0,58
Контрольная	9,04±0,46	26122,62±0,36
<i>p</i>	<i>p</i> <0,01	<i>p</i> <0,05

нечный клеточный осадок ресуспензировали в 1 мл раствора Хенкса (рН 7,4). Фосфатно-солевой буфер на всех этапах выделения лейкоцитов был охлажденным (+4°C). Выход лейкоцитов составлял 85–95%. Жизнеспособность клеток, определяемая в тесте с трипановым синим, составляла не менее 97%.

Далее опсонизацию зимозана мы проводили свежей человеческой плазмой крови. Для этого гепаринизированную кровь центрифугировали в течение 20 мин при 1500 g. Полученную плазму крови отбросили и перенесли в пробирку. Опсонизацию проводили из расчета 10 мг зимозана на 4 мл плазмы крови, предварительно разведенной фосфатным буфером в соотношении 1:2. Смесь тщательно ресуспендировали и помещали в термостат на 30–45 мин при 37°C. Через каждые 5–10 мин пробирку встряхивали. По истечении времени инкубации зимозан трижды отмывали 8 мл фосфатного буфера с помощью последовательного центрифугирования в течение 20 мин при 1500 g. Конечную концентрацию зимозана доводили до 10 мг/мл, затем его разливали по флаконам и хранили при -30°C.

Измерение люминол-зависимой хемилюминесценции лейкоцитов производили на отечественном хемилюминометре LUM – 5773. При этом в качестве измеряемых параметров использовали амплитуду и светосумму хемолюминесценции лейкоцитов:

- амплитуда хемолюминесценции лейкоцитов характеризует скорость продукции активных форм кислорода (АФК);
- светосумма отражает общее количество образующихся АФК за выбранный интервал времени.

Пациентам с выявленной необструктивной азооспермией по показаниям мы выполняли биопсию яичка, с последующим изучением гистологического препарата.

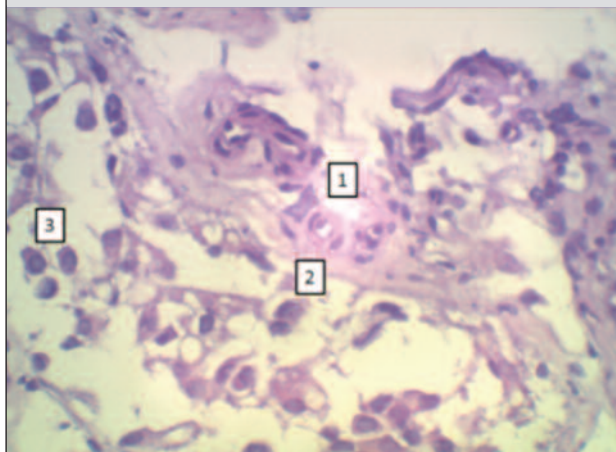
Статистическая обработка материала проводилась с использованием электронных таблиц «Excel» и программы «STATISTICA 6.0». При этом использовались следующие показатели: среднее значение (M) и среднеквадратичное отклонение (d). Оценивались общепринятые критерии оценки информативности теста: чувствительность, специфичность, диагностическая эффективность. Оценку достоверности различий между количественными показателями выполняли с помощью критерия Манна–Уитни. Для сравнения качественных параметров применяли точный критерий Фишера или χ^2 . Различия считали значимыми при *p*<0,05.

Результаты и обсуждение

У всех 24 человек основной группы исследования, предъявлявших жалобы на отсутствие беременности у партнерши более 12 мес по результатам спермограммы была выявлена необструктивная азооспермия. Анамнез жизни пациентов был не отягощен, мужчины отрицали травмы, эпидемический паротит, хирургические вмешательства на половых органах. Результаты клинического исследования не выявили каких-либо грубых отклонений от нормы. При ультразвуковом исследовании органов мошонки структурной патологии не выявлено (эхогенность яичка средняя, гипо- и гиперэхогенных участков в нем не выявлено, вены правого и левого семенного

Ткань яичка пациента основной группы (идиопатическая необструктивная азооспермия). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение $\times 20$.

1. Сосуд. 2. Стенка извитого семенного канальца. 3. Плазматические клетки.



канатика диаметром 2 мм, при пробе Вальсальвы до 3 мм, без признаков смены направления кровотока). Всем пациентам группы исследования был установлен диагноз идиопатическая необструктивная азооспермия.

Результаты сравнения функциональной активности лейкоцитов (амплитуда и светосумма) периферической крови путем их хемилюминесценции (ХЛ) у пациентов обеих групп исследования представлены в таблице.

Таким образом, результаты таблицы демонстрируют, что активность лейкоцитов периферической крови у пациентов необструктивной азооспермией достоверно выше чем, у здоровых пациентов. Лейкоциты служат основным источником продукции активных форм кислорода (АФК). А значит, повышенная активность лейкоцитов прямо пропорционально влияет на скорость и общее количество образования АФК, что приводит к оксидативному стрессу и нарушению сперматогенеза.

По показаниям, пациентам первой группы выполняли биопсию яичка. Ткань яичка подвергалась стандартной гистологической проводке. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и изучались под увеличением $\times 10$, $\times 40$ раз. Морфологические результаты исследования яичка у пациентов с идиопатической необструктивной азооспермией представлены на рисунке.

У пациентов с идиопатической необструктивной азооспермией мы выявили выраженное утолщение (гиалиноз) стенки извитого семенного канальца, атрофию сперматогенного эпителия и полное отсутствие зрелых сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца. Мы зарегистрировали резкое утолщение всех оболочек сосудов и отек периваскулярного пространства. Выше описанные явления в ткани яичка указывают на нарушение гемато-тестикулярного барьера, что ведет за собой проникновение токсических веществ и АФК в адлюминальный отдел извитого семенного канальца, и как следствие гибель клеток сперматогенеза. Интересно отметить, что как в паренхиме, так и в строме

яичка мы зафиксировали лейкоцитарную инфильтрацию и наличие плазматических клеток. Это подтверждает точку зрения, что клетки крови и соединительной ткани могут являться источником активных радикалов не только в сперме, но и в ткани яичка.

Когда, вследствие воспаления образование свободных радикалов превышает нормальные значения, развивается оксидативный стресс, что приводит к повреждению сперматозоидов. На фоне оксидативного стресса происходит повреждение мембраны сперматозоидов, снижение их подвижности и нарушение оплодотворяющей способности. Кроме того, АФК непосредственно повреждают ДНК хромосом (Н.И.Бойко и соавт., 2009; S.Као, 2007) и инициируют опосредованный эндонуклеазами апоптоз сперматозоидов (Г.Т.Сухих и соавт., 2009; R.Henkel и соавт., 2005), что приводит, в конечном счете, к бесплодию.

Полученные результаты требуют дальнейшего изучения, но служат важным шагом к пониманию биохимических основ инфертильности мужчин и могут быть использованы для разработки патогенетически обоснованных методов ее коррекции.

Выводы

Одной из причин необструктивной азооспермии является хроническое воспаление, которое вызывает оксидативный стресс. Измерение активности лейкоцитов является адекватным методом определения интенсивности свободнорадикальных процессов и рекомендуется для широкого внедрения в практику при диагностике тяжелых форм патоспермии, что позволит повысить качество обследования и результаты терапии.

Литература

1. Богданов Ю.А., Карпунина Т.И., Зуева Т.В. К вопросу о распространенности мужского бесплодия. Медицина и образование в Сибири. 2013; 5: 16–18. / Bogdanov Ju.A., Karpunina T.I., Zueva T.V. K voprosu o rasprostranennosti muzhskogo besplodija. Medicina i obrazovanie v Sibiri. 2013; 5: 16–18. [in Russian]
2. Виноградов И.В., Блохин А.В., Афанасьева Л.М., Габля М.Ю., Дендеберов Е.С., Капто А.А., Алексеев Р.А. Опыт применения L-карнитина в лечении секреторного бесплодия у мужчин (обзор литературы). Андрология и генитальная хирургия. 2009; 19–22. / Vinogradov I.V., Blohin A.V., Afanas'eva L.M., Gablija M.Ju., Dendeberov E.S., Kapto A.A., Alekseev R.A. Opyt primeneniya L-karnitina v lechenii sekretornogo besplodija u muzhchin (obzor literatury). Andrologija i genital'naja hirurgija. 2009; 19–22. In Russian]
3. Гамидов С.И., Иремашвили В.В., Тхагопсоева П.А. Терапия нарушения фертильности у мужчин: перспективные результаты европейских исследований. Эффективная фармакотерапия в урологии. 2009; 2: 26–30. / Gamidov S.I., Iremashvili V.V., Thagopsoeva P.A. Terapija narusheniya fertil'nosti u muzhchin: perspektivnye rezul'taty evropejskih issledovanij. Jefferktivnaja farmakoterapija v urologii. 2009; 2: 26–30. [in Russian]
4. Каприн А.Д., Костин А.А., Кульченко Н.Г., Бичерова И.А., Страчук А.Г., Алиев А.Р. Динамическая орхисцинтиграфия в диагностике микроциркуляторных расстройств при идиопатическом мужском бесплодии. Земский врач. 2013; 3 (20): 36–38. / Kaprin A.D., Kostin A.A., Kul'chenko N.G., Bicherova I.A., Strachuk A.G., Aliev A.R. Dinamicheskaja orhiscintigrafija v diagnostike mikroциркуляторных расстройств pri idiopaticheskom muzhskom besplodii. Zemskij vrach. 2013; 3 (20): 36–38. [in Russian]
5. Agarwal A, Allamaneni SS Free radicals and male reproduction. J Indian Med Assoc. 2011; 109: 184–187.
6. Ammar T, Sidhu PS, Wilkins CJ. Male infertility: the role of imaging in diagnosis and management. Br J. Radiol. 2012 Nov; 85–1: 59–68.
7. Bozhedomov V.A., Loginova N.S., Matveeva N.K., Golubeva E.L., Ushakova I.V., Lipatova N.A., Okhtirskaya T.A., Toroptseva M.V. Immunoendocrine aspects of male infertility. VI European Congress of Reproductive Immunology. Book of Abstracts. Moscow, June, 30–July 3, 2008; 12.
8. Fraczek M., Kurpisz M. Mechanisms of the harmful effects of bacterial semen infection on ejaculated human spermatozoa: potential inflammatory markers in semen. Folia Histochem Cytobiol. 2015; 53 (3): 201–17.
9. Isaiah I.N., Nche B.T., Nwagu I.G., Nnanna I.I. Current studies on bacteriospermia the leading cause of male infertility: a protOgO and potential threat towards means extinction. N Am J Med Sci. 2011; 3: 562–564.

Сведения об авторе:

Кульченко Нина Геннадьевна – к.м.н., врач уролог, врач ультразвуковой диагностики, старший преподаватель кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии медицинского института РУДН, Москва