

Антиоксидантные комплекс улучшают качество эякулята ЭКО пациентов в показателях подвижности, количества сперматозоидов и нуклеарной вакуолизации

Barbara Wirleitner¹, Pierre Vanderzwalmen¹, Astrid Stecher¹, Dietmar Spitzer², Maximilian Schuff¹, Delf Schwerda¹, Magnus Bach¹, Birgit Schechinger¹, Nicolas Herbert Zech^{1,2}

¹ Центры ЭКО профессора Цеха, Брегенц, Австрия

² Центры ЭКО профессора Цеха, Брегенц, Австрия. Адрес для корреспонденции: Николас Цех: тел.: +43-664-28439 96, Факс: +43-5574-448369, e-mail: n.zech@ivf.at, Roemerstrasse 2, A - 6900 Брегенц.

РЕЗЮМЕ

ЦЕЛЬ: Целью этого исследования является изучение влияния пероральных антиоксидантных комплексов на качество эякулята ЭКО пациентов с точки зрения анализа по критериям ВОЗ и морфологического анализа органелл подвижного сперматозоида (MSOME).

МЕТОДЫ: Образцы спермы отбирались у 147 пациентов перед проведением цикла ЭКО/ИМСИ и через 2-12 месяцев после применения антиоксидантных добавок. Анализ спермы проводился по критериям ВОЗ и MSOME. Сперматозоиды были разделены на группы в зависимости от размера нуклеарных вакуолей в головке сперматозоида. Пациенты были разделены на две группы: мужчины с олигоастенотератозооспермией (OAT) и мужчины без OAT. Между первым и вторым анализом спермы пациенты перорально принимали антиоксидантную добавку.

РЕЗУЛЬТАТЫ: После проведенной антиоксидантной терапии у пациентов наблюдалось существенное сокращение доли неподвижных сперматозоидов. Кроме того, после приема антиоксидантных добавок наблюдалась значительно большая доля сперматозоидов класса I, согласно критериям MSOME. У пациентов с OAT доля сперматозоидов класса I возросла, но незначительно. Однако, в этой группе наблюдалось резкое улучшение подвижности сперматозоидов, а также их количества, а также общего количества сперматозоидов.

ВЫВОДЫ: Результаты свидетельствуют о значительном улучшении качества эякулята, особенно у пациентов с OAT. Учитывая предполагаемую связь между качеством спермы, с одной стороны, и реактивными формами кислорода, с другой, наблюдаемые изменения параметров спермы указывают на то, что ухудшение качества эякулята, даже при неизменных морфологических признаках, может быть связано с окислительным стрессом. Из этого можно сделать вывод, что добавки антиоксидантов и микроэлементов являются чрезвычайно полезными показателями спермограммы для ЭКО пациентов, и в частности для пациентов с высоким уровнем отклонений в показателях спермограммы.

ВВЕДЕНИЕ

Вспомогательные репродуктивные технологии (BPT) помогают лечить бесплодие уже более трех десятилетий. Тем не менее, преодоление естественных преград в репродукции все еще поднимает вопросы относительно возможных негативных последствий в показателях неудач имплантации, выкидышей или врожденных пороков развития у потомства. Разные исследователи, сравнивавшие циклы BPT с естественными родами, наблюдали повышенный риск у детей, зачатых в результате экстракорпорального оплодотворения/внутриплазматической инъекции сперматозоида (ЭКО/ИКСИ). В связи с этим наблюдалась повышенная частота анеуплоидий [1], нарушений в импринтинге [2] и других дефектов [3, 4]. Хотя все еще определенно неясно, связаны ли эти аномалии с процедурами BPT, нет сомнений, что качество спермы может влиять на беременность и роды в показателях оплодотворения, частоты имплантации и выкидышей, а также здоровья потомства [5]. Поэтому выбор сперматозоидов для ИКСИ является деликатным и важным шагом, который, главным образом, осуществляется по морфологическим критериям.

Действительно, несколько публикаций указывают на то, что морфология явля-

ется ключевым параметром качества сперматозоидов. Плохая морфология сперматозоидов была связана с аномалиями акросомы, аномалиями количества хромосом, альтернативами в упаковке хроматина или возросшим повреждением ДНК [6-8]. Более того, было доказано, что повреждения ДНК, такие как фрагментация ДНК, наблюдались в сперматозоидах бесплодных мужчин чаще, чем в сперматозоидах фертильных мужчин [9]. Эти результаты наблюдений имеют особое значение для результата BPT. Было доказано, что повреждения ДНК сперматозоида ухудшают результаты репродукции [9, 10, 11].

10 лет назад Bartoovetal. [10] впервые провели детальное изучение морфологии сперматозоидов методом MSOME. Он позволяет изучать точную морфологию сперматозоидов на живом организме при очень высоком увеличении (более чем в 6000-12500 раз), обеспечивая таким образом возможность детального анализа спермы, в частности оценки головки сперматозоида. Метод MSOME позволяет наблюдать так называемые нуклеарные вакуоли, которые невозможно выявить при меньшем увеличении. В дальнейшем метод MSOME применялся в дополнение к ИКСИ, а ИМСИ (инъекция морфологически отобранного сперматозоида в цитоплазму ооцита) была успешно внедрена во BPT. С помощью метода MSOME сперматозоиды можно классифицировать в зависимости от наличия в головке сперматозоида нуклеарных вакуолей и их размера. Результаты исследований явно свидетельствуют о том, что размер и количество этих вакуолей в сперматозоидах значительно ухудшают результат BPT [12, 13]. Согласно с этими выводами, большое количество исследований с применением в циклах BPT обязательных критериев MSOME свидетельствуют о значительном улучшении частоты имплантации и беременности, а также статистически значимом сокращении частоты выкидышей [10, 14-18].

На протяжении последнего десятилетия все более распространенным становится мнение, что на качество эякулята влияют факторы окружающей среды, а также некоторые личные факторы. В связи с этим было постулировано воздействие таких факторов образа жизни, как курение, физкультура, способ питания и других личных и экологических факторов, на качество спермы согласно критериям ВОЗ [19-21]. Кроме того, недавно доказано, что в процессе старения хорошие морфологические характеристики спермы, определенные по критериям MSOME, ухудшаются [22]. Эти результаты свидетельствуют о том, что на несколько параметров спермограммы сперматозоидов, таких как морфология или подвижность может положительно или отрицательно влиять множество внутренних и внешних факторов.

Наряду с генетическими причинами, значительным фактором, влияющим на ограниченную оплодотворительную способность спермы, считается окислительный стресс (ОС) [23]. Окислительный стресс имеет место, когда образование или наличие таких окислителей, как реактивные формы кислорода (РФК), превышает совокупность антиоксидантов, молекул, которые могут удалить эти реактивные формы. Хотя производство РФК побочными продуктами нашей жизнедеятельности является физиологическим процессом, а РФК в небольшом количестве необходимы для обмена сигналами между клетками и выступают в качестве факторов межклеточной передачи сигналов, например во взаимодействии сперматозоида и яйцеклетки [24], нарушение равновесия может привести к повреждению мембраны сперматозоида, ДНК или ферментов. Ранее, на моделях животных было доказано и подтверждено на пациентах с мужским бесплодием, что недостаточное подавление РФК или рост производства РФК в семенной

плазме, вызванные воспалением, старением, неправильным питанием, генетическими причинами или чрезмерным загрязнением окружающей среды, могут ухудшить морфологию и подвижность сперматозоидов и, как следствие, ее функцию [24].

Целью этого исследования является оценка воздействия антиоксидантных добавок на параметры спермограммы у ЭКО пациентов. Оценивая качество сперматозоидов, но и вакуолизацию его головки, мы учитывали не только критерии ВОЗ, т.е. подвижность и концентрацию сперматозоидов, но и вакуолизацию головки сперматозоида согласно MSOME. Мы анализировали образцы спермы 147 мужчин, проходящих процедуру BPT, до и после 2-12-месячной терапии, состоявшей в пероральном применении антиоксидантных добавок.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Данное исследование, в котором принимали участие 147 пациентов нашей ЭКО клиники в Брегенце (Австрия), проводилось с января 2008 года по июль 2011 года. Анализировались образцы спермы пациентов, проходивших цикл ИМСИ, с целью определения морфологии согласно критериям MSOME, а также подвижности и количества сперматозоидов согласно критериям ВОЗ (Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию и обработке эякулята, 5-е издание, 2010 г.).

Пациенты для нашего исследования отбирались по следующим критериям: они соглашались принимать диетические добавки, они не проходили и не планировали проходить процедуру тестискулярной экстракции сперматозоидов (TESE), у них не было признаков азооспермии и никаких известных генетических причин для синдрома олигоастенотератозооспермии (OAT) (в частности, хромосомных aberrаций, например, синдрома Клайнфельтера, или других генетических дефектов). Кроме того, в прошлом они не подвергались химиотерапии или воздействию других вредных факторов и не принимали никаких других лекарств, влияющих на качество эякулята.

После первого анализа спермы все пациенты принимали диетическую добавку (Fertilovit® Mplus) на протяжении как минимум 2 месяцев, по одной капсуле два раза в сутки. Состав веществ приведен в Таблице 1. Результаты показали, что разные компоненты препарата Fertilovit® Mplus являются подходящими веществами для защиты спермы от окислительного стресса либо имеют другие полезные свойства.

| Состав | Суточная доза/2 капсулы |
|--------------------|-------------------------|
| Витамин С | 100 мг |
| Витамин Е | 100 мг |
| Фолиевая кислота | 500 мкг |
| Цинк | 25 мг |
| Селен | 100 мкг |
| N-ацетил-L-цистеин | 50 мг |
| L-карнитин | 300 мг |
| Цитруллин | 300 мг |
| Глутатионредуктаза | 50 мг |
| Ликопин | 4 мг |
| Кофермент Q10 | 15 мг |

Таблица 1: Состав веществ Fertilovit® Mplus
Рекомендуемая суточная доза: 2 капсулы

После курса антиоксидантной терапии, который длился от 2 до 12 месяцев (среднее значение – 3,5 месяца), образцы спермы были повторно проанализированы во время ИМСИ. До сих пор не было зафиксировано ни одного случая нежелательных побочных эффектов приема добавок.

Возраст пациентов колебался от 28 до 61 года (среднее значение – 39,3, 25-я и 75-я перцентиль: 35 и 43). Концентрация сперматозоидов и индекс их подвижности оценивались по критериям ВОЗ. Согласно этим критериям пациенты были разделены на две группы: пациентов с OAT и пациентов без OAT. Процедура промывки спермы проводилась после центрифугирования на трехслойном градиенте чистой спермы, как описывалось ранее [5]. Описывая вкратце, разжиженный эякулят осторожно наносится на градиент и центрифугируется при 375 g в течение 20 минут при комнатной температуре. Осадок сперматозоидов взвешивался в среднеканальцевой жидкости (HTF) дополненной человеческим сывороточным альбумином (HSA, LifeGlobal, Онтарио, Канада) и центрифугировался в течение 10 минут. После этого этапа промывки образцы хранились при комнатной температуре. Для анализа MSOME 1 мкл суспензии спермы переносили в чашки со стеклянным дном (WPI, Берлин, Германия) в микрокаплях с поливинил-пирролидиноном (PVP). Критерии MSOME анализировались при 6000-кратном увеличении с помощью инвертированного инференционного микроскопа Номарского Leica AM 6000 (Leica, Германия). В соответствии с критериями MSOME сперма классифицировалась на три категории в зависимости от формы [25] и наличия нуклеарных вакуолей (по Vanderzwalmen et al., 2008) [5]. Сперма 1-го сорта определялась нормальной формой и размером сперматозоидов, отсутствием вакуолей или лишь небольшими вакуолями (<4% головки сперматозоида). 2-й сорт:

нормальная форма и размер, но наличие одной или нескольких вакуолей (>4% головки сперматозоида). И наконец, сперма 3-го сорта характеризовалась содержанием сперматозоидов аномальной формы и/или размера с вакуолями или без них.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Статистический анализ проводился с помощью Статистического пакета для социальных наук (SPSS) (версия программного обеспечения 17.0 для Windows (SPSS Inc., США). Для анализа статистической значимости различий между группами (объем образца, общее количество подвижных сперматозоидов (TMSC) и критерии MSOME) применялся непараметрический критерий Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследуемую генеральную совокупность составляли 147 ЭКО пациентов. Пациенты были разделены на две группы: с OAT (концентрация сперматозоидов <15 млн/мл и прогрессивная подвижность <32%) и без OAT (концентрация сперматозоидов ≥15 млн/мл и/или прогрессивная подвижность ≥32%). Согласно этим критериям 39 пациентов были определены в группу с OAT, 108 пациентов – в группу без OAT (см. Таблицу II). Из общего количества этих 108 пациентов без OAT у 57 была выявлена нормозооспермия, а остальные 51 имели недостаточную подвижность сперматозоидов или их концентрацию (данные не приведены). По состоянию на дату начала терапии, средний возраст пациентов с OAT составлял 40,1, а пациентов без OAT – 39 лет. Как и ожидалось, параметры спермограммы, полученные в результате первого анализа спермы, свидетельствуют о том, что пациенты с OAT имели меньшую подвижность спермы (общая подвижность у пациентов с OAT составляла 20,9% против 54,0% у пациентов другой группы) и концентрацию сперматозоидов (2,5 млн/мл против 20,9 млн/мл). Кроме того, в группе пациентов с OAT наблюдался меньший объем эякулята (2,5 против 3,0 мл) и, что интересно, меньшая доля сперматозоидов класса I по MSOME (2,6% против 5,9%).

После периода приема антиоксидантных добавок, который длился от 2 до 12 месяцев (средние значения: 3,2 месяца у пациентов с OAT, 3,5 – у пациентов без OAT), проводился второй анализ спермограммы. Результаты (см. Таблицу II) свидетельствуют о значительно большем количестве прогрессивно-подвижных сперматозоидов в группе пациентов с OAT (0,4% против 2,4%, P<0,05). Общее количество сперматозоидов у пациентов с OAT значительно возросло (2,5 млн ± 5,0 против 6,7 млн ± 9,8, P<0,05), но в группе пациентов без OAT этот показатель увеличился не столь значительно.

Кроме того, наблюдалось очень значительное увеличение нелинейной подвижности (8,0% против 28,6%), P < 0,001. В соответствии с этим наблюдением доля неподвижных сперматозоидов резко сократилась (79,1% против 49,5%, P<0,001). В группе пациентов без OAT мы не наблюдали значительного увеличения прогрессивной подвижности (4,2% против 5,0%) или общей подвижности (54,0 против 56,7%).

Что касается морфологии спермы, то мы наблюдали тенденцию к увеличению количества сперматозоидов класса I по MSOME у пациентов с OAT (2,6% против 5,0%) и значительное увеличение количества сперматозоидов класса I по MSOME у всех пациентов (5,0 против 6,6%, P < 0,05).

Результаты второй спермограммы также показали увеличение, правда незначительное, количества сперматозоидов класса I у пациентов без OAT (7,2% против 5,9%).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сперматозоиды особенно чувствительны к окислительному стрессу. Во-первых, мембрана сперматозоида содержит множество ненасыщенных жирных кислот, расположенных к атакам РФК. Во-вторых, сперма очень уплотненная, что, с одной стороны, может защищать от РФК, но, с другой стороны, из-за уплотнения ДНК сперматозоидов транскрипционно неактивна и поэтому неспособна бороться с повышенными концентрациями РФК путем транскрипции ферментов, подавляющих РФК.

Существует гипотеза, что нарушение равновесия между РФК и антиокислительными веществами является причиной нескольких клинических картин бесплодия. Действительно, существует несколько механизмов зависимости между недостаточным подавлением РФК и заболеваниями человека [26]. Кроме того, плохое качество спермы, вызванное несколькими внутренними или внешними факторами, такими как воспаление, облучение или неправильное питание, объясняется ростом уровня РФК [27]. Преклонный возраст мужчин также ассоциируется с повышенным уровнем РФК [28] и поэтому может служить объяснением падения качества спермы в преклонном возрасте. В ряде публикаций описывается благотворное воздействие приема таких антиоксидантов, как аскорбиновая кислота, токоферолы, глутатион, N-ацетил-L-цистеин, ликопин и убихинон.

Акмал (Aktmal) и коллеги наблюдали значительное улучшение подвижности сперматозоидов у мужчин с олигозооспермией после 2-месячного курса приема аскорбиновой кислоты [29]. Мослеми (Moslemi) и Таванбахш (Tavanbakhsh) описывают улучшение параметров спермы у пациентов с астенозооспермией после приема витамина Е и селена [30]. Результаты рандомизированного, плацебо-контролируемого, двойного слепого исследования свидетельствуют о благотворном воздействии кофермента Q

| | | Все пациенты | | | Пациенты с нормозооспермией | | | Пациенты с олигозооспермией | | | Пациенты с астенозооспермией | | | Пациенты с OAT | | |
|--|---------------------------|--------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|-----------------------------|------------|------------------------------|-----------------------------|------------|----------------|-----------------------------|------------|
| | | До терапии | После приема антиоксидантов | P-значение | До терапии | После приема антиоксидантов | P-значение | До терапии | После приема антиоксидантов | P-значение | До терапии | После приема антиоксидантов | P-значение | До терапии | После приема антиоксидантов | P-значение |
| Количество пациентов | | 147 | | | 108 | | | 39 | | | 33 | | | 42 | | |
| Средний возраст в начале терапии (лет) | | 39,3 | | | 39 | | | 40,1 | | | 39,2 | | | 39,5 | | |
| Объем образца (мл) | | 2,9 ± 1,5 | 2,4 ± 1,4 | ** | 3,0 ± 1,3 | 2,4 ± 1,2 | *** | 2,5 ± 1,8 | 2,5 ± 1,7 | н.з. | 3,3 ± 1,2 | 2,7 ± 1,5 | ** | 2,5 ± 1,8 | 2,4 ± 1,7 | н.з. |
| Концентрация сперматозоидов (млн/мл) | | 16,0 ± 19,7 | 19,1 ± 22,7 | н.з. | 20,9 ± 20,7 | 23,6 ± 24,3 | н.з. | 2,5 ± 5,0 | 6,7 ± 9,8 | * | 15,5 ± 11,3 | 30,9 ± 15,4 | * | 2,6 ± 4,9 | 6,7 ± 9,6 | * |
| Подвижность спермы | Общая подвижность | 43,8 ± 54,6 | 38,4 ± 42,8 | н.з. | 58,4 ± 56,9 | 47,9 ± 44,4 | н.з. | 3,3 ± 3,5 | 12,2 ± 17,5 | * | 36,1 ± 16,9 | 58,0 ± 18,7 | ** | 21,8 ± 21,1 | 50,5 ± 26,8 | *** |
| | Сорт а | 45,2 ± 24,4 | 55,1 ± 22,2 | *** | 54,0 ± 18,7 | 56,7 ± 19,6 | н.з. | 20,9 ± 21,6 | 50,5 ± 27,8 | *** | 1,7 ± 4,7 | 6,6 ± 7,1 | ** | 0,3 ± 1,4 | 2,6 ± 5,7 | * |
| | Сорт b | 3,1 ± 5,9 | 4,3 ± 6,6 | н.з. | 4,2 ± 6,5 | 5,0 ± 6,8 | н.з. | 0,4 ± 1,4 | 2,4 ± 5,3 | * | 16,2 ± 9,4 | 34,8 ± 16,9 | *** | 8,2 ± 10,3 | 28,4 ± 24,2 | *** |
| | Сорт c | 27,7 ± 19,1 | 30,5 ± 20,4 | н.з. | 34,8 ± 16,4 | 31,2 ± 18,5 | н.з. | 8,0 ± 10,4 | 28,6 ± 24,9 | *** | 18,2 ± 16,2 | 16,5 ± 13,3 | н.з. | 13,3 ± 17,8 | 19,5 ± 23,7 | н.з. |
| | Сорт d | 14,4 ± 14,6 | 20,3 ± 18,8 | ** | 15,0 ± 13,0 | 20,6 ± 16,5 | ** | 12,5 ± 18,1 | 19,6 ± 24,1 | н.з. | 63,9 ± 16,9 | 42,0 ± 18,7 | *** | 78,5 ± 21,3 | 49,5 ± 26,8 | *** |
| | Прогрессивная подвижность | 54,8 ± 24,4 | 44,9 ± 22,2 | *** | 46,0 ± 18,7 | 43,3 ± 19,6 | н.з. | 79,1 ± 21,6 | 49,5 ± 27,8 | *** | 17,9 ± 9,5 | 41,5 ± 20,9 | *** | 28,5 ± 10,5 | 31,0 ± 25,1 | *** |

| | | Все пациенты | | | Пациенты с нормозооспермией | | | Пациенты с олигозооспермией | | | Пациенты с астенозооспермией | | | Пациенты с OAT | | |
|-----------------|-----------|--------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|-----------------------------|------------|------------------------------|-----------------------------|------------|----------------|-----------------------------|------------|
| | | До терапии | После приема антиоксидантов | P-значение | До терапии | После приема антиоксидантов | P-значение | До терапии | После приема антиоксидантов | P-значение | До терапии | После приема антиоксидантов | P-значение | До терапии | После приема антиоксидантов | P-значение |
| Критерии MOSOME | 1-ый сорт | 5,0 ± 5,5 | 6,6 ± 6,7 | * | 5,9 ± 5,7 | 7,2 ± 6,4 | н.з. | 2,6 ± 4,0 | 5,0 ± 7,2 | н.з. | 5,1 ± 5,2 | 8,4 ± 7,0 | * | 2,6 ± 1,4 | 5,0 ± 7,2 | н.з. |
| | 2-ой сорт | 39,5 ± 15,7 | 42,8 ± 14,7 | н.з. | 44,1 ± 12,9 | 44,7 ± 13,7 | н.з. | 26,8 ± 16,0 | 37,4 ± 15,8 | ** | 42,5 ± 11,7 | 41,8 ± 11,6 | н.з. | 26,9 ± 15,7 | 37,4 ± 15,8 | ** |
| | 3-ий сорт | 55,5 ± 18,4 | 50,6 ± 18,3 | * | 50,0 ± 15,2 | 48,0 ± 16,9 | н.з. | 70,6 ± 18,1 | 57,7 ± 20,1 | ** | 52,4 ± 13,1 | 49,8 ± 14,8 | н.з. | 70,5 ± 17,7 | 57,6 ± 20,1 | ** |

Таблица 2: Стандартный анализ спермы до и после приема антиоксидантных добавок.

Олигоастенотератозооспермия определялась согласно критериям ВОЗ. Классификация по MOSOME проводилась по Vanderzwalmenetal., 2008.

OAT = олигоастенотератозооспермия

н.з. = незначимый;

* = P < 0,05

** = P < 0,01

*** = P < 0,001

на количество и подвижность сперматозоидов у пациентов с идиопатической астенозооспермией [31]. В предварительном отчете исследования, проведенном на 30 бесплодных мужчинах, Гупта (Gupta) и Кумар (Kumar) указывают на улучшение подвижности и концентрации сперматозоидов в результате применения каротина и ликопина, обладающего антиокислительными и противовоспалительными свойствами [32]. Соль фолиевой кислоты снижает вероятность анеуплоидии и дисомии в сперматозоидах [33]. Цинк обладает антиокислительными свойствами и является кофактором семейства ферментов глутатионпероксидаз, подавляющих РФК. У бесплодных мужчин была обнаружена сниженная концентрация цинка в плазме эякулята [34]. Сообщалось, что N-ацетилцистеин (NAC) предотвращает окислительный стресс на моделях животных и у человека, сохраняя таким образом мужскую фертильность [35, 36]. Кроме того, NAC является предшественником трипептид-глутатиона, подавляющего РФК. Результаты некоторых исследований свидетельствуют о благотворном воздействии NO-донирующих аминокислот, таких как цитруллин или аргинин, улучшающих циркуляцию крови и тем самым уменьшающих окислительный стресс [36]. Хотя авторы нескольких исследований утверждают, что редокс-равновесие и прием антиоксидантных препаратов влияют на качество семени согласно критериям ВОЗ в показателях подвижности и количества клеток [38-41], это воздействие все еще остается предметом дискуссии.

Наши результаты соответствуют этим выводам. После приема пациентами диетических добавок мы наблюдали значительное улучшение качества спермы в показателях подвижности, количества и, более того, морфологии сперматозоидов.

В контексте значения антиоксидантов для удержания редокс-равновесия и предотвращения окислительного стресса ключевым аспектом следует назвать питание. Результаты недавно проведенного в нашем центре анкетного опроса 1499 мужчин – ЭКО пациентов свидетельствуют о том, что они потребляют в среднем 1,3 порции фруктов и овощей в день (неопубликованные данные). Это намного меньше дозы 3-5 порций в день, рекомендованной Совместной Экспертной Консультацией ФАО/ВОЗ по диете. Мужчинам-пациентам клиник для больных бесплодием необходимо напоминать о важности здоровых привычек в питании, советовать изменить пищу и напитки, которые они потребляют, бросить курить, а мужчинам, которые считают, что не смогут изменить свои привычки в питании, можно рекомендовать прием соответствующих антиоксидантных добавок.

Другим важным фокусом этого исследования был вопрос, влияет ли пероральная антиоксидантная терапия на появление нуклеарных вакуолей на головке сперматозоида. Мы наблюдали значительное увеличение доли сперматозоидов без вакуолей (Класс I) после приема антиоксидантных добавок. Хотя о предельно не ясно, являются

ся ли нуклеарные вакуоли следствием увеличения количества поврежденных ДНК [6,7], нарушений конденсации хроматина [8] или возможно других внутриклеточных событий, достаточно очевидно, что нуклеарные вакуоли отображают не физиологическое, а патологическое состояние. Принимая во внимание то, что вакуоли могут свидетельствовать о нарушенной упаковке ДНК, эпигенетических альтернативах или фрагментации ДНК на морфологическом уровне, и учитывая тот факт, что нуклеарные вакуоли влияют на результат ЭКО, наши результаты обеспечивают дополнительные доказательства благотворного воздействия оральной антиоксидантной терапии на качество спермы. Поскольку причины нуклеарной вакуолизации не до конца понятны, пути воздействия на процент вакуолизации всего лишь гипотетические. Обсуждать можно различные пути, например, улучшение конденсации спермы вследствие лучшего протаминирования, как результата улучшенной циркуляции крови и питательной поддержки, меньшей фрагментации ДНК, как результата сниженного окислительного стресса или меньшего воспаления внутри уrogenитального тракта, или улучшенной деятельности митохондрий. Чтобы ответить на этот вопрос необходимы дальнейшие исследования.

Наши данные свидетельствуют об улучшении параметром спермограммы после приема антиоксидантных добавок. В дополнение к большей доле подвижных сперматозоидов и большему количеству сперматозоидов мы наблюдали благотворное воздействие на морфологию в показателях образования вакуолей. Насколько нам известно, факт сокращения доли сперматозоидов с вакуолями вследствие приема антиоксидантных добавок описан впервые. Учитывая, что качество спермы является важнейшим фактором успеха любого лечения бесплодия и что, как доказано, морфология спермы отображает состояние здоровья сперматозоидов, можно сделать вывод, что эти результаты должны быть учтены при консультировании мужчин-пациентов перед лечением бесплодия.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Alukal, J.P. and Lamb D.J. (2008) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) – what are the risks? *Urol. Clin. North. Am.* 35, 277–288.
- Maher, E.R., Brueton, L.A., Bowdin, S.C., Luharia, A., Cooper, W., Cole, T.R., Macdonald, F., Sampson, J.R., Barratt, C.L., Reik, W. and Hawkins, M.M. (2003) Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J. Med. Genet.* 40, 62–64.
- Wen, S.W., Leader, A., White, R.R., Leveille, M.C., Wilkie, V., Zhou, J. and Walker, M.C. (2010) A comprehensive assessment of outcomes in pregnancies conceived by in vitro fertilization /intracytoplasmic sperm injection. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 150, 160–165.
- Funke, S., Flach, E., Kiss, I., Sandor, J., Vida, G., Bodis, J. and Ertl, T. (2010) Male reproductive tract abnormalities: more common after assisted reproduction? *Early Hum. Dev.* 86, 547–550.
- Vanderzwalmen, P., Hiemer, A., Rubner, P., Bach, M., Neyer, A., Stecher, A., Uher, P., Zintz, M., Lejeune, B., Vanderzwalmen, S., Cassuto, G. and Zech, N.H. (2008) Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod. BioMed. Online.* 17, 617–627.
- Garolla, A., Fortini, D., Menegazzo, M., De Toni, L., Nicoletti, V., Moretti, A., Selice, R., Engl, B. and Foresta, C. (2008) High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod. Biomed. Online.* 17, 610–6.
- Franco, J.G. Jr., Baruffi, R.L., Mauri A.L., Petersen, C.G., Oliveira, J.B. and Vagnini, L. (2008) Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod. Biomed. Online.* 17, 42–5.
- Perdrix, A., Travers, A., Chelli, M.H., Escalier, D., Do Rego, J.L., Milazzo, J.P., Mousset-Simeon, N., Mace, B. and Rives N. (2011) Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum. Reprod.* 26, 47–58.
- Zini, A. and Libman, J. (2006) Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ.* 175, 495–500.
- Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosowski, A., Menezo, Y. and Barak, Y. (2002) Real time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J. Androl.* 23, 1–8.
- Simon, L., Brunborg, G., Stevenson, M., Lutton, D., McManus, J. and Lewis, S.E. (2010) Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum. Reprod.* 25, 1594–608.
- Vanderzwalmen, P. and Fallet, C. (2010) *GynecolObstetBiolReprod (Paris)*. 39 Suppl, 22–5.
- de Almeida Ferreira Braga, D.P., Setti, A.S., Figueira, R.C., Nichi, M., Martinhago, C.D., Iaconelli, A. Jr. and Borges, E. Jr. (2011) Spermorganelle morphologic abnormalities: contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes. *Urology.* 78, 786–91.
- Berkovitz, A., Eltes, F., Ellebroggen, A., Peer, S., Feldberg, D. and Bartoov, B. (2006) Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum. Reprod.* 21, 1787–1790.
- Hazout, A., Dumont-Hassan, M., Junca, A.M., Cohen Bacrie, P. and Tesarik, J. (2006) Highmagnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online.* 12, 19–25.
- Antinori, M., Licata, E., Dani, G., Cerasico, F., Versaci, C., d'Angelo, D. and Antinori, S. (2008) Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod. Biomed. Online.* 16, 835–841.
- Nadalini, M., Tarozzi, N., Distratis, V., Scaravelli, G. and Borini, A. (2009) Impact of

intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review. *Reprod. Biomed. Online.* 19 Suppl 3, 45–55.

- Souza Setti, A., Ferreira, R.C., Paes de Almeida Ferreira Braga, D., de Cassia SavioFigueira, R., Iaconelli, A. Jr. and Borges, E. Jr. (2010) Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online.* 21, 450–5.
- Tunc, O., Bakos, H.W. and Tremellen, K. (2011) Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia.* 43, 121–8. doi: 10.1111/j.1439-0272.2009.01032.x.
- El-Melegy, N.T. and Ali, M.E., (2011) Apoptotic markers in semen of infertile men: Association with cigarette smoking. *37, 495–506.*
- Braga, D.P., Halpern, G., Figueira, Rde C., Setti A.S., Iaconelli, A. Jr. and Borges, E. Jr. (2012) Food intake and social habits in male patients and its relationship to intracytoplasmic sperm injectionoutcomes. *Fertil. Steril.* 97, 53–9.
- Silva, L.F., Oliveira, J.B., Petersen, C.G., Mauri, A.L., Massaro, F.C., Cavagna, M., Baruffi R.L. and Franco, J.G. Jr. (2012) The effects of male age on sperm analysis by motile sperm organelle morphology examination (MSOME). *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10, 19.
- Agarwal, A. and Allamaneni, S.S. (2011) Free radicals and male reproduction. *J Indian Med. Assoc.* 109, 184–87.
- Tremellen, K. (2008) Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum. Reprod. Update.* 14, 243–58.
- Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosovsky, A., Yagoda, A., Lederman, H., Artzi, S., Gross, M. and Barak, Y. (2003) *Fertil. Steril.* 80, 1413–9.
- Greaves, L.C., Reeve A.K., Taylor, R.W. and Turnbull, D.M. (2012) Mitochondrial DNA and disease. *J. Pathol.* 226, 274–86. doi: 10.1002/path.3028.
- Gharagzloo, P. and Aitken, R.J. (2011) The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum. Reprod.* 26, 1628–40.
- Cocuzza, M., Athayde, K.S., Agarwal, A., Sharma, R., Pagani, R., Lucon, A.M., Srougi, M. and Hallak, J. (2008) Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. *Urology.* 71, 490–4.
- Akmal, M., Qadri, J.Q., Al-Waili, N.S., Thangal, S., Haq, A. and Saloom, K.Y. (2006) Improvement in human semen quality after oral supplementation of vitamin C. *J. Med. Food. Fall;* 9, 440–2.
- Moslemi, M.K. and Tavanbakhsh, S. (2011) Selenium-vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. *Int. J. Gen. Med.* 4, 99–104.
- Balercia, G., Buldreghini, E., Vignini, A., Tiano, L., Paggi, F., Amoroso, S., Ricciardo-Lamonica, G., Boscaro, M., Lenzi, A. and Littarru, G. (2009) Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebocontrolled, double-blind randomized trial. *Fertil. Steril.* 91, 1785–92.
- Gupta, N.P. and Kumar, R. (2002) Lycopene therapy in idiopathic male infertility—a preliminary report. *Int. Urol. Nephrol.* 34, 369–72.
- Young, S.S., Eskenazi, B., Marchetti, F.M., Block, G. and Wyrobek, A.J. (2008) The association of folate, zinc and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy non-smoking men. *Hum. Reprod.* 23, 1014–22.
- Colagar, A.H., Marzony, E.T. and Chaichi, M.J. (2009) Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr. Res.* 29, 82–8.
- Reddy, P.S., Rani, G.P., Sainath, S.B., Meena, R. and Supriya, Ch. (2011) Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J. TraceElem. Med. Biol.* 25, 247–53.
- Ciftci, H., Verit, A., Savas, M., Yeni, E. and Erel O. (2009) Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status. *Urology.* 74, 73–6.
- Appleton, J. (2002) Arginine: Clinical potential of a semi-essential amino. *Altern Med. Rev.* 7, 512–22. Review.
- Varghese, A.C., du Plessis, S.S. and Agarwal, A. (2008) Male gamete survival at stake: causes and solutions. *Reprod. Biomed. Online.* 17, 866–80.
- Agarwal, A., Desai, N.R., Ruffoi, R. and Carpi, A. (2008) Lifestyle and testicular dysfunction: a brief update. *Biomed. Pharmacother.* 62, 550–3.
- Comhaire, F. The role of food supplementation in the treatment of the infertile couple and for assisted reproduction. *Andrologia.* (2010) 42, 331–40. doi: 10.1111/j.1439-0272.2009.01025.x.
- Ross, C., Morriss, A., Khairy, M., Khalaf, Y., Braude, P., Coomarasamy, A. and El-Toukhy, T. (2010) A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod. Biomed. Online.* 20, 711–723.

ПРИМЕЧАНИЯ

ВРТ: вспомогательная репродуктивная технология
 ФАО: Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (FAO)
 Человеческий сывороточный альбумин: HSA
 Канальцевая жидкость: HTF
 ИКСИ: внутриплазматическая инъекция сперматозоида
 ИМСИ: инъекция морфологически отобранного сперматозоида в цитоплазму ооцита
 ЭКО: экстракорпоральное оплодотворение
 MSOME: морфологический анализ оргanelл подвижного сперматозоида
 NAC: N-ацетилцистеин
 ОАТ: олигоастенотерозоспермия
 Окислительный стресс: ОС
 Поливинил-пироллидин: PVP
 РВК: реактивные формы кислорода
 Статистический Пакет для Социальных Наук: SPSS
 TESE: тестикулярная экстракция сперматозоидов