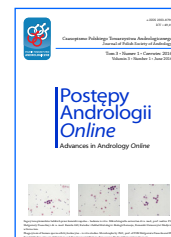




Czasopismo Polskiego Towarzystwa Andrologicznego

Postępy Andrologii Online

Advances in Andrology Online

<http://www.postepyandrologii.pl>

OCENA DOJRZAŁOŚCI CHROMATYNY PLEMNIKÓW MĘŻCZYZN Z NIEPŁODNYCH PAR EVALUATION OF SPERM CHROMATIN MATURITY OF MEN OF INFERTILE COUPLES

Katarzyna Marchlewska¹, Emilia Bogołębska¹, Renata Walczak-Jędrzejowska¹,
Elżbieta Oszukowska², Krzysztof Kula¹, Jolanta Słowikowska-Hilczner¹

¹ Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ² II Klinika Urologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Autor do korespondencji/corresponding author: Jolanta Słowikowska-Hilczner, Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Sterlinga 5, 91-425 Łódź, tel.: 42 633 07 05 (jolanta.slowikowska-hilczner@umed.lodz.pl)

Otrzymano/received: 27.01.2016 r. • Zaakceptowano/accepted: 30.06.2016 r.



Katarzyna Marchlewska – dr n. med., absolwentka Uniwersytetu Łódzkiego oraz Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, biolog, specjalność biochemia, diagnosta laboratoryjny. Nauczyciel akademicki w Zakładzie Endokrynologii Płodności Katedry Andrologii i Endokrynologii Płodności Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Współwykonawca polskich i europejskich projektów badawczych. Pierwszy autor i współautor 41 publikacji naukowych. Członek Polskiego Towarzystwa Andrologicznego, członek Międzynarodowego Towarzystwa Andrologicznego, Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu oraz Komisji Andrologii Komitetu Biologii Rozrodu PAN. Praca zawodowa i naukowa autorki związana jest z badaniami nad czynnością męskiego układu płciowego i jego zaburzeniami oraz diagnostyką andrologiczną.

Katarzyna Marchlewska – PhD, graduate of the University of Lodz and Medical University of Lublin as biologist, specializing in biochemistry, laboratory diagnostician. Academic teacher at the Division of Reproductive Endocrinology, Department of Andrology and Reproductive Endocrinology at the Medical University of Lodz. Researcher in Polish and European scientific projects. The first author and co-author of 41 scientific publications. Member of the Polish Society of Andrology, a member of the International Society of Andrology, Polish Society for Reproductive Medicine and Andrology Commission Committee of Reproductive Biology Sciences. Professional and scientific work is associated with the research on the male reproductive system function and its disorders, and andrology diagnostics.

Streszczenie

Uzasadnienie i cel pracy. Podstawowe badanie nasienia nie zawsze jednoznacznie wskazuje na przyczynę zaburzeń płodności u mężczyzn. Jedną z dodatkowych metod diagnostycznych jest ocena dojrzałości chromatyny plemników, odzwierciedlająca prawidłową przebudowę i kondensację materiału genetycznego podczas spermiogenezy. Celem pracy było znalezienie związku między podstawowymi parametrami nasienia a dojrzałością chromatyny plemników.

Materiał i metody. W grupie 63 mężczyzn zgłaszających się z powodu niepłodności partnerskiej wykonano podstawowe badanie nasienia (WHO, 2010). Do badania dojrzałości chromatyny zastosowano barwienie plemników kwaśnym roztworem błękitu aniliny (AB) (czerwone – chromatyna dojrzała, niebieskie – chromatyna niedojrzała).

Wyniki. Odsetek plemników z dojrzałą chromatyną (komórki AB-negatywne) mieścił się w zakresie 8–83 (mediana: 45%). Pacjenci z nieprawidłowym odsetkiem plemników AB-negatywnych (<70%) mieli statystycznie istotnie niższą koncentrację plemników w porównaniu do badanych, u których wykazano ≥70% komórek AB-negatywnych (mediana: 18,7 vs. 60,6 mln/mL). Z kolei, pacjenci z odsetkiem ≥4% plemników o prawidłowej morfologii mieli istotnie wyższy odsetek plemników AB-negatywnych (mediana: 49,7 vs. 36,9%). Dojrzałość chromatyny plemników korelowała z waukolizacją główki plemnika w obrębie regionu postakrosomalnego ($r_s = 0,46$) oraz z koncentracją leukocytów w nasieniu ($r_s = -0,26$).

Interpretacja i wnioski. Wyniki sugerują, że zaburzeniom koncentracji i morfologii plemników, jak również liczby leukocytów w ejakulacie mogą towarzyszyć nieprawidłowości przebudowy chromatyny plemników manifestujące się zwiększoną ilością histonów jądrowych.

Słowa kluczowe: plemniki, chromatyna, kondensacja DNA, niepłodność męska

Abstract

Background and objectives. The basic semen analysis not always clearly indicate the cause of fertility problems in men. One of the additional diagnostic method is assessment of sperm chromatin maturity reflecting proper remodeling and condensation of the genetic material during spermiogenesis. The aim of the study was to find the relationship between the basic parameters of semen and sperm chromatin maturity.

Material and methods. The standard semen analysis (WHO, 2010) was carried out on spermatozoa of men ($n = 63$) of infertile couples. The staining with acidic solution of aniline blue (AB) (red – mature chromatin, blue – immature chromatin) was used to evaluate the sperm chromatin maturity.

Results. The proportion of mature sperm chromatin (AB-negative cells) was in the range 8–83 (median 45%). Patients with abnormal percentage of AB-negative sperms (<70%) had a significantly lower concentration of spermatozoa in comparison to subjects with AB-negative cells ≥70% (median 18.7 vs. 60.6 million / mL). On the other hand, patients with percentage of sperm cells with normal morphology ≥4% had significantly higher percentage of AB-negative spermatozoa (median 49.7 vs. 36.9%). The maturity of the sperm chromatin correlated with the sperm head vacuolisation within the postacrosomal region ($r_s = 0.46$), and the concentration of leukocytes in the semen ($r_s = -0.26$).

Interpretation and conclusions. The results suggest that disorders of sperm concentration and morphology as well as the number of leukocytes in the ejaculate may be accompanied by abnormalities of sperm chromatin remodeling manifested by an increased amount of nuclear histones.

Key words: spermatozoa, chromatin, DNA condensation, male infertility

Skróty / Abbreviations

AB – błękit aniliny (ang. *aniline blue*), WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

Wstęp

Chromatyna, struktura występująca w jądrze komórkowym, zbudowana jest z DNA, białek histonowych i nie-histonowych. Chromatyna zawarta w plemnikach dzięki obecności protamin charakteryzuje się znacznie większą kondensacją niż chromatyna komórek somatycznych. Taka budowa materiału genetycznego pozwala na znaczne zmniejszenie wielkości jądra komórkowego i umożliwia szybkie dostarczenie ojcowskiego materiału genetycznego, ale przede wszystkim warunkuje jego odporność na działanie czynników fizycznych oraz chemicznych w trakcie wędrówki plemników przez męski, a następnie żeński układ płciowy do bańki jajowodu, gdzie następuje zapłodnienie (Björndahl i Kvist, 2010, 2014; Francis i wsp., 2014; Gawecka i wsp., 2015; Miller, 2015).

Kondensacja materiału genetycznego w plemnikach odbywa się w czasie przekształcania spermatyd w plemniki (końcowy etap procesu spermatogenezy) (Kazienko i wsp., 2012). W tym procesie białka histonowe zostają zastąpione przez inne, bardziej zasadowe białka, tzw.

protaminy, bogate w argininę i cysteinę. Duża zawartość argininy warunkuje tworzenie silnych wiązań między cząsteczkami DNA, podczas gdy cysteina (utlenianie grup tiolowych SH) umożliwia tworzenie wiązań disiarczkowych zarówno wewnątrz, jak i między cząsteczkami protaminy, co powoduje zdecydowanie większą kondensację materiału genetycznego w główce plemnika (Björndahl i Kvist, 2010; Rathke i wsp., 2014; Wiland i wsp., 2006). Protaminy w połączeniu z DNA tworzą struktury zwane toroidami, zbudowane z silnie upakowanych pętli DNA powiązanych i stabilizowanych jonami cynku oraz cysteiną (Björndahl i Kvist, 2010, 2011; Ward, 2010). Plemniki, w których wymiana histonów na protaminy nie dokonała się, nie mają odpowiedniej kondensacji chromatyny (niedojrzała chromatyna), a tym samym nie mają dostatecznej ochrony materiału genetycznego, co może prowadzić do fragmentacji i uszkodzeń DNA (Björndahl i Kvist, 2010, 2011; Francis i wsp., 2014).

Ocena jakościowa i ilościowa nasienia jest podstawowym badaniem służącym do oceny stanu płodności u mężczyzn. Wieloletnie obserwacje pozwoliły

stwierdzić, iż podstawowe badanie nasienia nie jest wystarczające do jednoznacznej oceny płodności mężczyzny oraz dokładnego określenia przyczyny niepłodności (Björndahl, 2011; Cooper i wsp., 2010; Kazienko i wsp., 2012; Pizzol i wsp., 2014; WHO, 2010). Wykluczenie czynnika męskiego w niepłodności partnerskiej tylko na podstawie badania nasienia skłania lekarzy do wykonywania u kobiety badań, które są często inwazyjne i kosztowne. Powoduje to jednocześnie rosnący stres u obojga partnerów, co ma niekorzystny wpływ na czynność gonad i utrudnia prokreację (Boivin i Gameiro, 2015). Z drugiej strony odstępstwa od wartości referencyjnych w podstawowym badaniu nasienia nie zawsze łączą się z niemożnością uzyskania ciąży (Buck Louis i wsp., 2014; Jørgensen i wsp., 2012).

Ocena dojrzałości chromatyny plemników może być jednym z dodatkowych badań nasienia, które umożliwi diagnostykę przyczyn męskiej niepłodności. Budowa materiału genetycznego gamety męskiej wpływa bowiem na zdolność plemników do zapłodnienia oraz na rozwój zarodka. Prawidłowa dojrzałość chromatyny plemników wskazuje na większą szansę osiągnięcia samoistnej ciąży oraz może ułatwić kwalifikację pacjenta do zastosowania technik wspomaganego rozrodu pomimo obniżonych wartości podstawowych parametrów nasienia. Wpływa także na zwiększenie prawdopodobieństwa urodzenia zdrowego dziecka (Boe-Hansen i wsp., 2006; Boitrelle i wsp., 2015; Gawecka i wsp., 2015; Zhao i wsp., 2014; Zini i wsp., 2014). Zatem celem niniejszych badań było znalezienie związku między podstawowymi parametrami nasienia a dojrzałością chromatyny plemników.

■ Materiał i metody

Badania wykonano¹ na ejakulowanych plemnikach uzyskanych od mężczyzn (n = 63) w wieku 20–58 lat (33 ± 6), którzy byli pacjentami Poradni Andrologii i Endokrynologii Płodności przy Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym im. Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi, z powodu niepłodności pary. Mężczyźni otrzymali informację na temat badania i wyrazili pisemną zgodę na uczestnictwo w badaniu. Wykluczono pacjentów z azoospermią.

Podstawowe badanie seminologiczne (objętość i pH nasienia, koncentracja, całkowita liczba plemników w ejakulacie, ruchliwość, żywotność i morfologia plemników) wykonano zgodnie z rekomendacjami ŚWIATOWEJ Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) z 2010 r. (WHO, 2010). Morfologię męskich gamet oceniano na podstawie barwienia rozmazów plemników metodą Papanicolaou. Weryfikowano obecność wakuoli w regionie akrosomalnym i postakrosomalnym i wyrażano jako wartość odsetka plemników, u których te zjawiska stwierdzono. Na podstawie standardowej oceny nasienia wyróżniono następujące kategorie seminologiczne: normozoospermia – 23 przypadki; oligozoospermia

(koncentracja plemników <15 mln/mL) 21 przypadków; astenozoospermia (ruch postępowy <32%) 16 przypadków; teratozoospermia (odsetek prawidłowych plemników <4%) 23 przypadki. W tej grupie znaleźli się również pacjenci z więcej niż jednym parametrem badania ogólnego odbiegającym od wartości referencyjnej, tj. z astenoteratozoospermią – 5 przypadków; oligoteratozoospermią – 3 przypadki; oligoastenozoospermią – 2 przypadki i z oligoastenoteratozoospermią – 5 przypadków. Natywne próbki nasienia zamrażano w temp. –20°C do czasu wykonania oceny chromatyny plemników (ok. 2 mies.). Po rozmrożeniu nasienie było płukane roztworem soli fizjologicznej i odwirowywane przy prędkości 3000 g przez 5 minut. Czynność tę powtarzano dwukrotnie.

Do oceny dojrzałości chromatyny plemników wykorzystana została metoda barwienia kwaśnym błękitem aniliny (AB, ang. *aniline blue*) za pomocą dostępnego komercyjnie testu (SpermFunc® Histone, BRED Life Science Technology Inc., Chiny). W skład testu wchodziły: bufor fosforanowy, bufor TRIS (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol), roztwór błękitu aniliny, roztwór ksantenu oraz formaldehyd 4% (w/v). Barwienie wykonano według instrukcji producenta. Barwienie błękitem aniliny umożliwia weryfikację plemników z obecnością resztkowych histonów, bowiem barwnik ten selektywnie łączy się z bogatymi w lizynę histonami i ujawnia anomalie w kondensacji chromatyny plemników (Sellami i wsp., 2013). W teście tym plemniki charakteryzujące się pełną dojrzałością chromatyny (bez resztkowych histonów, komórki AB-negatywne) mają główki zabarwione na kolor czerwony (rycina 1). Z kolei plemniki z nieprawidłowo skondensowaną chromatyną (komórki AB-pozytywne), w której obecne są w dużej ilości resztkowe histony, mają główki zabarwione na niebiesko. Według sugestii producenta testu plemniki zabarwione na kolor pośredni zaliczono do nieprawidłowych. Dolna wartość referencyjna dla plemników z prawidłowo dojrzałą chromatyną – wg producenta – to 70%. Ocena dojrzałości chromatyny plemników przeprowadzono w mikroskopie świetlnym, stosując powiększenie ×1000 (Nikon Eclipse E600, Japonia).

Uzyskane wyniki zaprezentowano, podając przedział zmienności, medianę, średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. Zgodność rozkładu zmiennych ciągłych z rozkładem normalnym sprawdzono za pomocą testu Shapiro–Wilk, przyjmując zgodność na poziomie istotności $p > 0,05$ (>5%). Porównanie dwóch grup niezależnych w zakresie badanych zmiennych dokonano, stosując nieparametryczny test istotności U Manna–Whitneya. Współzależność zmiennych zweryfikowano, obliczając współczynniki korelacji rang Spearmana. Poziom istotności statystycznej przyjęto dla $p < 0,05$.

■ Wyniki

Wyniki standardowej oceny seminologicznej wraz z oceną dojrzałości chromatyny plemników (mediana: 45%, zakres: 8–83%) przedstawiono w tabeli 1. Tylko w przypadku 8 mężczyzn (12,7%) spośród 63 badanych stwierdzono ≥70% plemników z prawidłowo dojrzałą chromatyną. Porównując standardowe parametry seminologiczne między grupą mężczyzn, u których wykazano ≥70% plemników AB-negatywnych (komórki z dojrzałą chromatyną) a grupą badanych, u których stwierdzono <70% plemników AB-negatywnych, różnicę statystycznie istotną

¹ Procedura badań była pozytywnie zaopiniowana przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – numer zezwolenia RNN/125/12/KE.



Ryc. 1. Mikroskopowa ocena dojrzałości chromatyny plemników barwionych kwaśnym błękitem aniliny (AB) i roztworem ksantenowym. Strzałka biała – plemniki z dojrzałą chromatiną (główki plemników czerwone, komórki AB-negatywne), strzałka czarna – plemniki z niedojrzałą chromatiną (główki plemników ciemnoniebieskie, komórki AB-pozytywne), grot strzałki – pośrednie formy plemników zakwalifikowane jako niedojrzałe (główki plemników ciemnoniebieskie i częściowo czerwone, komórki AB-pozytywne). Skala = 10 μm

Fig. 1. Microscopic evaluation of chromatin maturity of sperm stained with acidic aniline blue (AB) xanten solution. White arrow – sperm cells with mature chromatin (red sperm head, AB-negative cells), black arrow – sperm cells with immature chromatin (dark blue sperm head, AB-positive cells), arrowhead – sperm cells with intermediate stain included into immature (dark blue and partly red sperm head, AB-positive cells). Scale bar = 10 μm

Tabela 1. Wyniki standardowej oceny seminologicznej oraz testu z błękitem aniliny (AB) (n = 63)

Table 1. Descriptive statistics of standard semen and aniline blue (AB) analyses (n = 63)

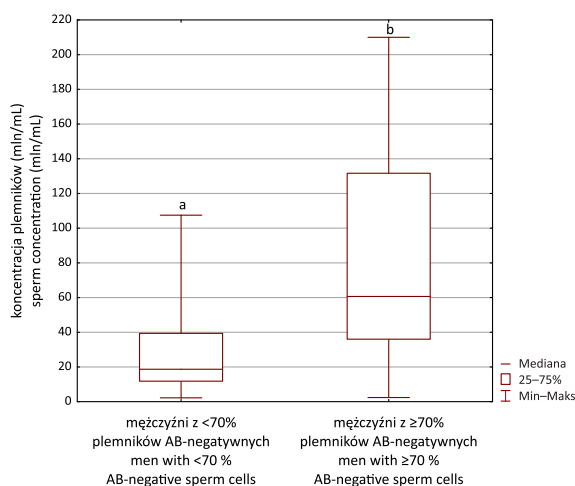
Parametr / Parameter	$\bar{X}$ (SD)	Mediana Median	Zakres Range
Wiek (lata) / Age (years)	33 (6,0)	33,0	20,0–58,0
Objętość (mL) / Volume (mL)	4,2 (1,5)	4,0	1,1–8,3
Koncentracja plemników (mln/mL) / Sperm concentration (mln/mL)	35 (37,0)	24,0	2,0–210,0
Całkowita liczba plemników (mln/ejakulat) / Total sperm number (mln/ejaculate)	136 (141,0)	87,0	4,0–780,0
Plemniki ruchliwe (%) / Motile sperm cells (%)	58 (14,0)	59,0	24,0–82,0
Plemniki z ruchem postępowym (%) / Sperm cells with progressive motility (%)	40 (18,0)	43,0	4,0–73,0
Plemniki z brakiem ruchu (%) / Immotile sperm cells	41 (14,0)	39,0	18,0–76,0
Żywotność plemników (% plemników eozyno-negatywnych) / Sperm vitality (% eosine-negative sperm cells)	80 (9,0)	83,0	49,0–93,0
Plemniki z prawidłową morfologią (%) / Sperm cells with normal morphology (%)	3 (2,0)	3,0	0,0–7,0
Plemniki z wakuolami w regionie akrosomalnym (%) / Sperm cells with vacuoles in the acrosomal region (%)	32 (17,0)	33,0	2,0–83,0
Plemniki z wakuolami w regionie postakrosomalnym (%) / Sperm cells with vacuoles in the postacrosomal region (%)	5 (3,0)	4,0	0,0–17,0
Plemniki z resztkową cytoplazmą (%) / Sperm cells with residual cytoplasm (%)	2 (2,0)	1,0	0,0–9,0
Koncentracja komórek okrągłych (mln/mL) / Round cells concentration (mln/mL)	3 (7,0)	1,0	0,0–45,0
Koncentracja leukocytów (mln/mL) / Leukocyte concentration (mln/mL)	1 (6,0)	0,0	0,0–45,0
Plemniki z prawidłową dojrzałością chromatyny (% komórek AB-negatywnych) / Sperm cells with normal maturity of chromatin (% AB-negative cells)	45 (16,0)	45,0	8,0–83,0

$\bar{X}$ (SD) – średnia arytmetyczna (odchylenie standardowe) / arithmetic mean (standard deviation)

($p = 0,01$) wykazano tylko w przypadku koncentracji męskich gamet. Mężczyźni, u których odsetek plemników z dojrzałą chromatiną wynosił ≥ 70 , wykazywali istotnie wyższą koncentrację plemników w ejakulacie (mediana: 60,6 vs. 18,7 mln/mL) (rycina 2). Z kolei, porównując mężczyzn z $\geq 4\%$ ($n = 40$) i $< 4\%$ ($n = 23$) plemników o prawidłowej morfologii stwierdzono statystycznie istotnie ($p = 0,015$) wyższy odsetek plemników AB-negatywnych w grupie mężczyzn z prawidłową morfologią plemników

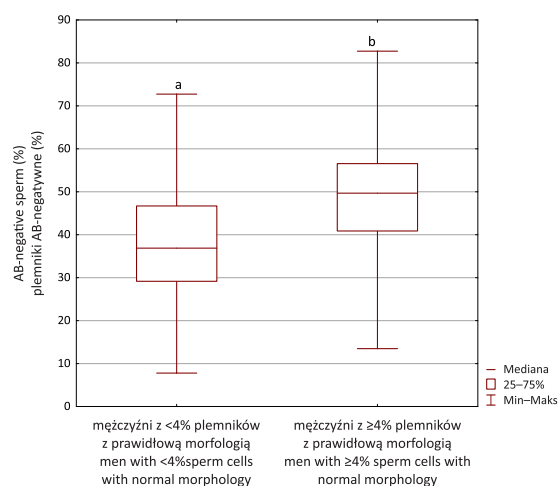
(mediana: 49,7 vs. 36,9%) (rycina 3). Ponadto, analiza korelacji rang Spearmana² ujawniła statystycznie istotne ($p < 0,05$) zależności między odsetkiem plemników AB-negatywnych a odsetkiem plemników zawierających wakuole w obrębie regionu postakrosomalnego główki

2 Przyp. red.: uzyskane wartości współczynnika korelacji interpretowano w następujący sposób: $< 0,2$ – brak związku liniowego; $0,2$ – $0,4$ – słaba zależność; $0,4$ – $0,7$ – umiarkowana zależność; $0,7$ – $0,9$ – silna zależność; $> 0,9$ – bardzo silna zależność



Ryc. 2. Porównanie koncentracji plemników w nasieniu mężczyzn z <70% (n = 55) i ≥70% (n = 8) plemników AB-negatywnych (test z błękitem aniliny). Test U Manna-Whitneya, ab: p = 0,01

Fig. 2. Comparison of sperm concentration between subjects with <70% (n = 55) and with ≥70% (n = 8) AB-negative sperm cells (aniline blue assay). Mann-Whitney U-test, different letters (ab) denote significant difference between compared groups, p = 0.01



Ryc. 3. Porównanie odsetka plemników AB-negatywnych (test z błękitem aniliny) między grupami mężczyzn z <4% (n = 23) i ≥4% (n = 40) plemników z prawidłową morfologią. Test U Manna-Whitneya, ab: p = 0,015

Fig. 3. Comparison of the percentage of AB-negative sperm cells (aniline blue assay) between groups with <4% (n = 23) and with ≥4% (n = 40) spermatozoa with normal morphology. Mann-Whitney U test, different letters (ab) denote significant difference between compared groups, p = 0.015

Tabela 2. Korelacja rang Spearmana (r_s) między wynikami test z błękitem aniliny (plemniki AB-negatywne) a wiekiem mężczyzn oraz standardowymi parametrami seminologicznymi (n = 63)

Table 2. Correlation (rank Spearman correlation coefficient – r_s) of aniline blue assay (AB-negative sperm cells) with age and parameters of standard semen analysis (n = 63)

Parametr / Parameter	r_s	p
Wiek (lata) / Age (years)	-0,050	0,697
Objętość (mL) / Volume (mL)	0,007	0,955
Koncentracja plemników (mln/mL) / Sperm concentration (mln/mL)	-0,048	0,704
Całkowita liczba plemników (mln/ejakulat) / Total sperm number (mln/ejaculate)	-0,050	0,692
Plemniki ruchliwe (%) / Motile sperm cells (%)	0,042	0,740
Plemniki z ruchem postępowym (%) / Sperm cells with progressive motility (%)	0,114	0,370
Plemniki z brakiem ruchu (%) / Immotile sperm cells	0,001	0,988
Żywotność plemników (% plemników eozyno-negatywnych) / Sperm vitality (% eosine-negative sperm cells)	0,050	0,694
Plemniki z prawidłową morfologią (%) / Sperms with normal morphology (%)	0,063	0,620
Plemniki z wakuolami w regionie akrosomalnym (%) / Sperm cells with vacuoles in the acrosomal region (%)	0,124	0,332
Plemniki z wakuolami w regionie postakrosomalnym (%) / Sperm cells with vacuoles in the postacrosomal region (%)	0,456	<0,0001
Plemniki z resztkową cytoplazmą (%) / Sperm cells with residual cytoplasm (%)	-0,145	0,254
Koncentracja komórek okrągłych (mln/mL) / Round cells concentration (mln/mL)	-0,214	0,091
Koncentracja leukocytów (mln/mL) / Leukocyte concentration (mln/mL)	-0,257	0,041

p < 0,05 – korelacja statystycznie istotna; p < 0.05 – correlation statistically significant

plemnika ($r_s = 0,46$) oraz między koncentracją leukocytów ($r_s = -0,26$). W przypadku pozostałych parametrów nie stwierdzono statystycznie istotnych korelacji (tabela 2). Na podstawie wielkości współczynnika korelacji można przyjąć istnienie umiarkowanej zależności między dojrzałością chromatyny a odsetkiem plemników z wakuolami w regionie postakrosomalnym oraz istnienie słabej zależności między koncentracją leukocytów. Dokonano analizy korelacji między odsetkiem plemników AB-negatywnych a morfologią plemników w grupie mężczyzn o prawidłowej morfologii (z ≥4%, n = 40) oraz osobno u mężczyzn

z teratozoospermia i uzyskano wartości nieznamiennie statystycznie (odpowiednio $r_s = -0,16$ i $r_s = -0,07$).

Dyskusja

Wraz z postępem medycyny oraz rozwojem nowych możliwości diagnostycznych nasuwają się wątpliwości co do wystarczającej roli podstawowego badania nasienia w diagnostyce niepłodności u mężczyzn, zwłaszcza w tzw. niepłodności idiopatycznej. Opracowanie nowych technik

pozwalających na bardziej szczegółową analizę poszczególnych elementów ejakulatu umożliwia uzyskanie nowych informacji na temat jakości nasienia. Między innymi standardowa ocena seminologiczna nie daje pewności co do zdolności plemników do zapłodnienia komórki jajowej i dalszego rozwoju zarodka. Tymczasem nowe metody diagnostyczne mogą wykazać zmiany w komórkach na poziomie molekularnym, np. związane z materiałem genetycznym (*Iranpour, 2014; Krausz i wsp., 2015*). Tego typu analizy wydają się szczególnie ważne w przypadku kwalifikacji pacjenta do technik wspomaganego rozrodu (*Kazerooni i wsp., 2009; Kazienko i wsp., 2012*).

W niniejszej pracy jako badanie dodatkowe zastosowano ocenę dojrzałości chromatyny plemników (test z AB). Według zaleceń producenta testu za wartość referencyjną uznano $\geq 70\%$ plemników z prawidłową dojrzałością chromatyny (komórki AB-negatywne). Wśród mężczyzn z niepłodnych par tylko u 12,7% (8 z 63 badanych) wykazano nasienie z odsetkiem plemników $\geq 70\%$ z prawidłową dojrzałą chromatiną. Niektórzy autorzy (*Auger i wsp., 1990; Sellami i wsp., 2013; Zhang i wsp., 2015*) uznają jednak wartość 80% plemników z prawidłową dojrzałością chromatyny za dolną granicę wartości referencyjnej. Przy takim założeniu jeszcze mniejszy odsetek mężczyzn (1,6%) biorących udział w opisywanym badaniu miałby prawidłowe pod tym względem plemniki.

Poszukuje się związku między dojrzałością chromatyny plemników a standardowymi parametrami seminologicznymi (*Kim i wsp., 2013; Sellami i wsp., 2013*), co pozwoliłoby na dalsze prawidłowe postępowanie diagnostyczne i terapeutyczne. W pracy *Bianchi i wsp. (1996)* wykazano zależność między niedojrzałością chromatyny plemników a obniżeniem koncentracji oraz żywotności plemników. Pacjenci z dużym odsetkiem plemników z nieprawidłową dojrzałością chromatyny mieli znamienne niższą koncentrację plemników niż pacjenci z dużym odsetkiem plemników z prawidłową dojrzałością chromatyny, co może wskazywać na upośledzenie procesu przekształcania spermatyd w plemniki w nabłonku plemnikotwórczym. Ponadto, *Bianchi i wsp. (1996)* nie uzyskali korelacji między dojrzałością chromatyny plemników a ich morfologią, co było zgodne z wynikami badań autorskich, jednak mężczyźni z teratozoospermia ($<4\%$ plemników o prawidłowej budowie) mieli istotnie niższy odsetek plemników z dojrzałą chromatiną (rycina 3). Podobne wyniki uzyskali *Boitrelle i wsp. (2012)*. Wykazali oni, że niedojrzała chromatina występowała częściej w plemnikach o nieprawidłowej morfologii (z wakuolami). Z kolei, *Monte i wsp. (2013)* nie stwierdzili statystycznie istotnych różnic w odsetku plemników z prawidłową dojrzałością chromatyny pomiędzy grupami mężczyzn z odsetkiem plemników z prawidłową morfologią ($\geq 4\%$) i nieprawidłową ($<4\%$). Nie można jednak wykluczyć, że plemniki morfologicznie prawidłowe oceniane w mikroskopie świetlnym nie mają zmian molekularnych chromatyny. *Boitrelle i wsp. (2015)* sugerują, że nawet w przypadku plemnika

o prawidłowej strukturze mogą mieć miejsce zaburzenia np. kondensacji jego chromatyny. Konsekwencją tego zjawiska jest zwiększone ryzyko użycia plemnika o takim typie zaburzenia w technikach rozrodu wspomaganego. Potwierdzają to prace wykazujące, że problem uzyskania i utrzymania ciąży związany jest z nieprawidłową dojrzałością chromatyny (*Dogan i wsp., 2015; Hammadeh i wsp., 1998; Kazerooni i wsp., 2009; Talebi i wsp., 2012, 2016*).

W przedstawianej pracy stwierdzono istotną statystycznie zależność, według której rosnącemu odsetkowi plemników z dojrzałą chromatiną towarzyszył wzrost odsetka plemników z wakuolizacją w regionie postakrosomalnym. Jest to zjawisko trudne do wytłumaczenia, ponieważ pochodzenie wakuoli w plemnikach jest zjawiskiem słabo poznany. Według zaleceń WHO (2010) najwyżej dwie jasne, małe wakuole zajmujące $\leq 20\%$ prawidłowej powierzchni główki w części akrosomalnej uważa się za zjawisko prawidłowe. Część postakrosomalna nie powinna zawierać wakuoli, a jeśli są obecne, takie plemniki zalicza się do nieprawidłowych morfologicznie (*Park i wsp., 2014; WHO, 2010*). W badanej grupie pacjentów zjawisko występowania wakuoli w regionie postakrosomalnym jest dość słabo wyrażone (mediana 4%), wartość maksymalna 17% (tabela 1). Należałoby zbadać to zjawisko u pacjentów, u których wakuolizacja jest nasiloną.

Wakuole mogą powstawać w procesie dojrzewania plemników. Pierwsze wakuole w główce plemnika pojawiają się pod koniec procesu spermatogenezy. W obrębie najądrzy plemniki podlegają dalszym zmianom morfologicznym, jak i czynnościowym (*Cooper, 2007*). Pojawia się coraz więcej wakuoli, ale o małych rozmiarach (*Tanaka i wsp., 2012*). Tak więc plemniki zbyt wcześnie uwolnione z nabłonka plemnikotwórczego do światła dróg wyprowadzających nasienie i zbyt krótko przebywające w najądrzach charakteryzują się brakiem pełnej dojrzałości morfologicznej, a jednocześnie mogą zawierać małą ilość wakuoli.

Powstawanie wakuoli w główkach plemników może być zjawiskiem patologicznym. *Perdrix i Rives (2013)* wysunęli hipotezę, według której występowanie dużych wakuoli w plemnikach może być bezpośrednio związane z anomaliami na poziomie materiału genetycznego, w szczególności z niedojrzałością chromatyny. Hipoteza ta została potwierdzona poprzez wykazanie, że dojrzałość chromatyny jest wyższa w plemnikach całkowicie pozbawionych wakuoli. Stwierdzono bowiem, że obecność >3 , nawet małych, wakuoli w obrębie główki plemnika świadczy o zaburzeniach protaminacji materiału genetycznego (*Boitrelle i wsp., 2012, 2015; Garolla i wsp., 2008; Khalifa i wsp., 2008; Setti i wsp., 2013; Tamburrino i wsp., 2012*). *Cassuto i wsp. (2012)* wykazali, że plemniki z nieprawidłowościami w obrębie główek mają dwukrotnie wyższy odsetek zaburzeń chromatyny. Ponadto autorzy ci pokazali silne, dodatnie korelacje między obecnością dużych wakuoli a niskim stopniem protaminacji plemników.

Osobnym zagadnieniem, które zasługuje na uwagę, jest obecność wakuoli powstałych na skutek procedur stosowanych w podstawowym badaniu nasienia, m.in. z powodu inkubacji w temp. 37°C, a także na skutek działania wolnych rodników tlenowych znajdujących się w powietrzu atmosferycznym (*Peer i wsp.*, 2007; *Perdrix i Rives*, 2013; *Setti i wsp.*, 2013). Udowodniono także, iż zamrażanie i rozmrażanie próbki nasienia (tak jak w omawianych badaniach) powoduje wystąpienie przedwczesnej reakcji akrosomalnej, a co za tym idzie nadmierny wyrzut enzymów uszkodzających nukleoproteiny (*Boitrelle i wsp.*, 2012). Dodatkowo płukanie plemników może prowadzić do zmniejszenia ilości białek w nasieniu oraz do inaktywacji antyoksydantów, co prowadzi do zmniejszenia stabilności DNA.

Źródłem dużej ilości wolnych rodników tlenowych, które są przyczyną stresu oksydacyjnego uszkodzającego m.in. DNA plemników, są leukocyty (*Walczak-Jędrzejowska i wsp.*, 2014). Podczas toczącego się stanu zapalnego w układzie moczowo-płciowym u mężczyzn w nasieniu można wykazać obecność białych krwinek (leukocytów). Najczęściej dotyczy to stanów zapalnych gruczołów dodatkowych (prostaty, pęcherzyków nasennych), nie można jednak wykluczyć jądrowego pochodzenia stanu zapalnego (*Weidner i wsp.*, 2013). Jednym z powikłań może być zaburzenie spermatogenezy zachodzącej w jądrach (*Krause*, 2008). Jak wcześniej zaobserwowano, materiał genetyczny plemnika dojrzewa na poziomie spermatydy, w związku z czym toczący się w obrębie jąder stan zapalny, wpływając na proces spermatogenezy, powiązany jest z obniżoną dojrzałością plemników opuszczających przedwcześnie nabłonek plemnikotwórczy. *La Vignera i wsp.* (2015) podkreślają, że obecność leukocytów w nasieniu nie jest jedynie odpowiedzią na pojawiające się mikroorganizmy, ale także ich zadaniem jest usuwanie niedojrzałych komórek spermatogenezy uwalnianych z nabłonka plemnikotwórczego. Dzięki temu w nasieniu współistnieje podwyższona liczba niedojrzałych męskich gamet wraz z podwyższoną koncentracją leukocytów. W niniejszej pracy obserwacja ta została potwierdzona poprzez ujemną korelację pomiędzy odsetkiem plemników z dojrzałą chromatyną a koncentracją leukocytów w nasieniu.

Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników wydaje się, że zaburzeniom koncentracji i morfologii plemników, jak również liczby leukocytów w ejakulacie mogą towarzyszyć nieprawidłowości przebudowy chromatyny plemników manifestujące się zwiększoną ilością histonów jądrowych. Na uwagę zasługuje fakt, że zaburzenia kondensacji chromatyny plemników dotyczą znacznej grupy pacjentów leczonych z powodu niepłodności. Należy jednak podkreślić, że ze względu na małą liczebność grupy badawczej reprezentowanej przez mężczyzn leczonych z powodu

niepłodności oraz brak grupy odniesienia (zdrowi mężczyźni z normozoospermia i/lub płodni) uzyskane zależności wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach.

Podziękowania

Praca sponzorowana z działalności statutowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 503/1-089-03/503-01 oraz grantu Narodowego Centrum Nauki UMO-2012/05/B/NZ5/01308.

Piśmiennictwo

- Auger J., Mesbah M., Huber C., Dadoune J.P.*: Aniline blue staining as a marker of spermchromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl.* 1990, 13 (6), 452–462. PMID: 1710607.
- Bianchi P.G., Manicardi G.C., Urner F., Campana A., Sakkas D.*: Chromatin packing and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 1996, 2 (3), 139–144. PMID: 9238672.
- Björndahl L.*: What is normal semen quality? On the use and abuse of reference limits for the interpretation of semen analysis results. *Hum Fertil (Camb).* 2011, 14 (3), 179–186. doi: 10.3109/14647273.2011.580823. PMID: 21770820.
- Björndahl L., Kvist U.*: A model for the importance of zinc in the dynamics of human sperm chromatin stabilization after ejaculation in relation to sperm DNA vulnerability. *Syst Biol Reprod Med.* 2011, 57, 86–92. doi: 10.3109/19396368.2010.516306. PMID: 21204594.
- Björndahl L., Kvist U.*: Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod.* 2010, 16 (1), 23–29. doi: 10.1093/molehr/gap099. PMID: 19933313.
- Björndahl L., Kvist U.*: Structure of chromatin in spermatozoa. *Adv Exp Med Biol.* 2014, 791, 1–11. doi: 10.1007/978-1-4614-7783-9_1. PMID: 23955669.
- Boe-Hansen G.B., Fedder J., Ersbøll A.K., Christensen P.*: The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 2006, 21 (6), 1576–1582. PMID: 16543258.
- Boitrelle F., Albert M., Theillac C., Ferfour F., Bergere M., Vialard F. i wsp.*: Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. *J Androl.* 2012, 33 (6), 1371–1378. doi: 10.2164/jandrol.112.016980. PMID: 22700764.
- Boitrelle F., Pagnier M., Athiel Y., Swierkowski-Blanchard N., Torre A., Alter L. i wsp.*: A human morphologically normal spermatozoon may have non-condensed chromatin. *Andrologia.* 2015, 47(8), 879–886. doi: 10.1111/and.12341. PMID: 25220830.
- Boivin J., Gameiro S.*: Evolution of psychology and counseling in infertility. *Fertil Steril.* 2015, 104 (2), 251–259. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.05.035. PMID: 26092131.
- Buck Louis G.M., Sundaram R., Schisterman E.F., Sweeney A., Lynch C.D., Kim S. i wsp.*: Semen quality and time to pregnancy: the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment Study. *Fertil Steril.* 2014, 101 (2), 453–462. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.10.022. PMID: 24239161.
- Cooper T.G.*: Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J Androl.* 2007, 9, 533–539.
- Cooper T.G., Noonan E., von Eckardstein S., Auger J., Baker H.W., Behre H.M. i wsp.*: World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 2010, 16 (3), 231–245. doi: 10.1093/humupd/dmp048. PMID: 19934213.
- Dogan S., Vargovic P., Oliveira R., Belser L.E., Kaya A., Moura A. i wsp.*: Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls. *Biol Reprod.* 2015, 92 (4), 1–9. doi: 10.1095/biolreprod.114.124255. PMID: 25673563.

- Francis S., Yelumalai S., Jones C., Coward C.: Aberrant protamine in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Hum Fertile (Camb)*. 2014, 17 (2), 80–89. doi: 10.1019/14647273.2014.915347. PMID: 24869677.
- Garolla A., Fortini D., Menegazzo M., De Toni L., Nicoletti V., Moretti A. i wsp.: High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online*. 2008, 17 (5), 610–616. PMID: 18983744.
- Gawecka J.E., Ribas-Maynou J., Benet J., Ward W.S.: A model for the control of DNA integrity by the sperm nuclear matrix. *Asian J Androl*. 2015, 17 (4), 610–615. doi: 10.4103/1008-682X.153853. PMID: 25926613.
- Hammadeh M.E., Stieber M., Haidl G., Schmidt W.: Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia*. 1998, 30 (1), 29–35. PMID: 9567167.
- Iranpour F.G.: The effects of protamine deficiency on ultrastructure of human sperm nucleus. *Adv Biomed Res*. 2014, 3, 24. doi: 10.4103/2277-9175.124666. PMID: 24592371.
- Jørgensen N., Joensen U.N., Jensen T.K., Jensen M.B., Almstrup K., Olesen I.A. i wsp.: Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *BMJ Open*. 2012, 2 (4). doi: 10.1136/bmjopen-2012-000990. PMID: 22761286.
- Kazerooni T., Asadi N., Jadid L., Kazerooni M., Ghanami A., Ghaffarpasand F. i wsp.: Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained abortion. *J Assist Reprod Genet*. 2009, 26 (11–12), 591–596. doi: 10.1007/s10815-009-9361-3. PMID: 19894107.
- Kazienko A., Piasecka M., Rymaszewska A., Gączarzewicz D., Kurzawa R., Frączek M. i wsp.: Molekularne markery niepłodności męskiej: zmiany polimorficzne genów białek chromatyny plemnika – część I. *Postępy Biologii Komórki*. 2012, 39 (3), 345–370.
- Khalifa T.A.A., Rekkas C.A., Lymberopoulos A.G., Sioga A., Dimitriadis I., Papanikolaou Th.: Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2008, 104 (2–4), 143–163. PMID: 17398042.
- Kim H.S., Kang M.J., Kim S.A., Oh S.K., Kim H., Ku S.Y. i wsp.: The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clin Exp Reprod Med*. 2013, 40 (1), 23–28. doi: 10.5653. PMID: 23614112.
- Krause W.: Male accessory gland infection. *Andrologia*. 2008, 40 (2), 113–116. doi: 10.1111/j.1439-0272.2007.00822.x. PMID: 18336461.
- Krausz C., Escamilla A.R., Chianese C.: Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*. 2015, 150(5), 159–174. doi: 10.1530/REP-15-0261. PMID: 26447148.
- Miller D.: Confrontation, Consolidation, and Recognition: The Oocyte's Perspective on the Incoming Sperm. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015, 5 (8). doi: 10.1101/cshperspect.a023408. PMID: 25957313.
- Monte G.L., Murisier F., Piva I., Germond M., Marci R.: Focus on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a mini – review. *Asian J Androl*. 2013, 15 (5), 608–615. doi: 10.1038/aja.2013.54. PMID: 23832017.
- Peer S., Eltes F., Berkovitz A., Yehuda R., Itsykson P., Bartoov B.: Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37°C? *Fertil Steril*. 2007, 88(6), 1589–1594. PMID: 17481619.
- Perdrix A., Rives N.: Motile sperm organelle morphology examination (MSOME) and sperm head vacuoles: state of the art in 2013. *Hum Reprod Update*. 2013, 19(5), 527–541. doi: 10.1093/humupd/dmt021. PMID: 23825157.
- Pizzol D., Bertoldo A., Foresta C.: Male infertility: biomolecular aspects. *Biomol Concepts*. 2014, 5(6), 449–456. doi: 10.1515/bmc-2014-0031. PMID: 25390025.
- Rathke C., Baarends W.M., Awe S., Renkawitz-Pohl R.: Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1839(3), 155–168. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.08.004. PMID: 24091090.
- Sellami A., Chakroun N., Ben Zarrouk S., Sellami H., Kebaili S., Rebai T. i wsp.: Assessment of chromatin maturity in human spermatozoa: useful aniline blue assay for routine diagnosis of male infertility. *Adv Urol*. 2013: 578–631. PMID: 24198830.
- Setti A.S., Paes de Almeida Ferreira Braga D., Iaconelli Jr. A., Aoki T., Borges Jr. E.: Twelve years of MSOME and IMSI: a review. *Reprod Biomed Online*. 2013, 27 (4), 338–352. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.06.011. PMID: 23948449.
- Talebi A.R., Fesahat F., Mangoli E., Ghasemzadeh J., Nayeri M., Sadeghian-Nodoshan F.: Relationship between sperm protamine deficiency and apoptosis in couples with unexplained repeated spontaneous abortions. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2016, 14, 199–204.
- Talebi A.R., Vahidi S., Aflatoonian A., Ghasemi N., Ghasemzadeh J., Firoozabadi R.D.: Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia*. 2012, 44, 462–470.
- Tamburrino L., Marchiani S., Montoya M., Elia Marino F., Natali I., Cambi M. i wsp.: Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl*. 2012, 14 (1), 24–31. doi: 10.1038/aja.2011.59. PMID: 22138903.
- la Vignera S., Condorelli R.A., Morgia G., Favilla V., Russo G.I., Cimino S. i wsp.: Different levels of Cd45pos leukocytes in the semen of patients with low testicular volume. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2015, 28 (1), 85–92. doi: 10.1177/0394632015572748. PMID: 25816410.
- Ward W.S.: Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod*. 2010, 16 (1), 30–36. doi: 10.1093/molehr/gap080. PMID: 19748904.
- Weidner W., Pilatz A., Diemer T., Schuppe H.C., Rusz A., Wagenlehner F.: Male urogenital infections: impact of infection and inflammation on ejaculate parameters. *World J Urol*. 2013, 31(4), 717–723. doi: 10.1007/s00345-013-1082-7. PMID: 23857546.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. World Health Organization Press, Geneva 2010.
- Wiland E., Żegała M., Kurpisz M.: Topologia chromosomów w jądrze komórkowym. *Plemnik. Część 2. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2006, 60, 343–351.
- Park Y.S., Park S., Ko D.S., Park D.W., Seo J.T., Yang K.M.: Observation of sperm-head vacuoles and sperm morphology under light microscope. *Clin Exp Reprod Med*. 2014, 41 (3), 132–136. doi: 10.5653/cerm.2014.41.3.132. PMID: 25309858.
- Zhang M-H., Zhang A-D., Shi Z-D., Wang L.G., Qiu Y.: Changes in levels of seminal nitric oxide synthase, macrophage migration inhibitory factor, sperm dna integrity and caspase-3 in fertile men after scrotal heat stress. *PLoS ONE*. 2015, 10 (10), e0141320. doi:10.1371/journal.pone.0141320. PMID: 26512992.
- Zhao J., Zhang Q., Wang Y., Li Y.: Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2014, 102 (4), 998–1005. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.06.033. PMID: 25190048.
- Zini A., Albert O., Robaire B.: Assessing sperm chromatin and DNA damage: clinical importance and development of standards. *Andrology*. 2014, 2 (3), 322–325. doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00193.x. PMID: 24520005.