doi: 10.17116/repro201723190-95

Показатели функциональной зрелости сперматозоидов при первичной оценке эякулята

И.И. ВИТЯЗЕВА*, И.И. БАРМИНА, С.В. БОГОЛЮБОВ, М.В. АЛТАШИНА, Р.Ю. ЛЮТЫЙ, Т.В. МУН, О.Ю. РАЗИНА, акад. РАН И.И. ДЕДОВ

ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации (дир. — акад. РАН И.И. Дедов), Москва, Россия, 117036

Цель исследования — сравнить результаты HBA-теста у пациентов с нормо- и патозооспермией и определение основных параметров спермограммы, при которых HBA-тест может быть предложен для проведения.

Материал и методы. Проведено семиологическое исследование и HBA-тест в день сдачи эякулята у 102 пациентов. Стандартная спермограмма выполнялась согласно руководству ВОЗ 2010 г., а HBA-тест — согласно рекомендациям производителя (ORIGIO, Дания). По результатам спермограммы пациенты были разделены на две группы. 1-я группа (54 пациента) — нормозооспермия, 2-я группа (48) — патозооспермия. Для получения прогностических значений по концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов на величину HBA-теста все пациенты были разделены на 8 групп, с нисходящими значениями HBA-теста. Статистическую обработку данных в сравниваемых группах проводили с помощью корреляционного анализа и *t*-критерия Стьюдента.

Результаты. Среднее количество сперматозоидов в 1 мл эякулята в 1-й и 2-й группах составило 76,7±7,26 и 32,3±6,39 млн соответственно. Подвижность сперматозоидов в 1-й группе — 54,7±1,78%, во 2-й группе — 32,4±4,00%. При анализе значений HBA-теста в группах сравнения были получены статистически значимые различия — 73,3±3,04 и 61,4±4,79% соответственно ($p \leq 0,05$).

Возможными предикторными значениями для назначения HBA-теста являются: концентрация сперматозоидов ≤41 млн/мл, прогрессивная подвижность ≤38%, нормальная морфология ≤3%.

Выводы. Результаты исследования показали существенное снижение значений HBA-теста в группе с патозооспермией. Проведение анализа на связывание с гиалуронаном тем пациентам, у которых значения спермограммы равны или ниже предикторных показателей, возможно, поможет улучшить результативность программ ЭКО.

Ключевые слова: сперматозоид, спермограмма, HBA-тест, гиалуронан.

Spermatozoa functional maturity markers in primary ejaculate assessment

I.I. VITYAZEVA, I.I. BARMINA, S.V. BOGOLYUBOV, M.V. ALTASHINA, R.YU. LYUTYY, T.V. MUN, O.YU. RAZINA, I.I. DEDOV

Endocrinology Research Centre Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Director — academician of RAS I.I. Dedov) Moscow, Russia, 117036

Objective. To compare the HBA-test results in patients with normozoospermia and pathozoospermia and to assess the basic parameters of semen analysis in which the HBA-test can be used.

Material and methods. Semen analysis and HBA-test were performed in 102 patients. Patients were divided into two groups: group 1 (54 men) with normozoospermia, group 2 (48) with pathozoospermia. All patients were stratified in 8 groups with descending results of the HBA-test to receive the prognostic values for concentration, motility and morphology of spermatozoa according to HBA-test.

Results. The average concentration of spermatozoa in groups 1 and group 2 were $76.7 \pm 7.26 \times 10^6$ and $32.3 \pm 6.39 \times 10^6$/ml, respectively. Sperm motility in Group 1 was 54.7±1.78% and in Group 2 it was 32.4±4.00%. Significant differences were statistically obtained by analyzing the HBA-test results in comparison groups. Possible predictors for HBA-test assignment was the concentration of $\leq 41 \cdot 10^6$/ml, progressive motility ≤38%, standard morphology ≤3%.

Conclusions. The data showed a significant reduction of HBA-test results in the pathozoospermia group. Analysis of hyaluronan binding in the patients who have semen analysis results equal or lower than sperm predictors may help to improve the effectiveness of IVF programs.

Keywords: sperm, semen analysis, HBA-test, hyaluronan.

С внедрением вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) в повседневную практику лечения бесплодия супружеских пар семиологический анализ стал стандартным начальным исследованием для мужчины. Спермограмма позволяет оценить многие количественные характеристики эякулята, но не да-

© Коллектив авторов, 2017

*e-mail: eko_enc@mail.ru

ет ответа о функциональной зрелости сперматозоидов. Поиск новых физиологических методов определения зрелости привел к появлению HBA-теста (Sperm-Hyaluronan Binding Assay, анализ на связывание спермиев с гиалуроновой кислотой, или гиалуронаном) и внедрению его в рутинную практику эмбриологической лаборатории.

HBA-тест основан на том же принципе, что и селекция сперматозоидов при естественном оплодотворении, достигающих ооцитарно-кумулюсного комплекса (ОКК) в ампулярном отделе маточной трубы. Известно, что в фаллопиевой трубе гиперактивированные сперматозоиды преодолевают главный компонент экстрацеллюлярного матрикса ОКК — линейный полисахарид гиалуронан и достигают прозрачной оболочки [1—3]. Гиалуронан не только удерживает клетки лучистого венца вместе, формируя лабиринтную систему [4], но и играет решающую роль в селекции сперматозоидов [5]. Пенетрация внеклеточного матрикса становится возможной, так как гиперактивированные сперматозоиды несут на своей плазмолемме поверхностную гиалуронидазу к гиалуронану. Эти рецепторы, названные SPAM1 [sperm adhesion molecule 1 (PH-20 hyaluronidase, *zona pellucida* binding)], приобретаются мембраной клетки на терминальных этапах спермиогенеза [6—8].

SPAM1 — одноцепочечный гликопротеин с гликозилфосфатидилинозитольной областью, благодаря которой этот белок крепится к плазматической мембране сперматозоида. Помимо якорной области, в SPAM1 имеются функциональные домены. Нейтральный каталитический домен осуществляет гиалуронидазную активность в отношении кумулюсного матрикса при нейтральном значении pH [9—11]. В условиях акросомной реакции, когда акросома сливается с плазмолеммой спермия и высвобождает свое содержимое, растворимую форму гиалуронидазы, активируется еще и кислотный каталитический домен SPAM1, обеспечивающий гиалуронидазную активность в *zona pellucida* и перивителлиновом пространстве, облегчая пенетрацию [12—14]. Регуляторным звеном в работе SPAM1 является HSPA2 (heat shock protein A2). Этот белок теплового шока А2, относящийся к классу шаперонов, обеспечивает изменение конфигурации и экспрессии молекул SPAM1 в процессе капацитации. HSPA2 регулирует экспрессию SPAM1 на поверхности сперматозоида таким образом, что при проникновении через кумулюсный матрикс экспрессия SPAM1 максимальна [15—18].

На сегодняшний день наличие рецепторов к гиалуронану на поверхности мужской половой клетки рассматривается как отличительный признак зрелого сперматозоида. Именно поэтому использование теста на связывание сперматозоидов с гиалуроновой кислотой (HBA-тест) позволяет провести быструю и неинвазивную оценку функциональной зрелости сперматозоидов вне зависимости от семиологического анализа.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Оценить результаты HBA-теста у пациентов с нормозооспермией и патозооспермией.
2. Установить наличие или отсутствие связи между значениями HBA-теста и основными показателями семиологического анализа: концентрацией, подвижностью и морфологией сперматозоидов.
3. Выявить возможные предикторные критерии спермограммы для проведения HBA-теста.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведена стандартная спермограмма и HBA-тест в день сдачи эякулята у 102 пациентов, проходивших лечение в отделении ВРТ ФГБУ ЭНЦ в период с января 2014 г. по январь 2016 г. Семиологическое исследование выполнялось согласно руководству ВОЗ 2010 г., а HBA-тест, согласно рекомендациям производителя (ORIGIO, Дания). Статистическую обработку данных в сравниваемых группах проводили с помощью корреляционного анализа и *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам спермограммы пациенты были разделены на две группы: 1-я группа (54 пациента) — нормозооспермия, 2-я группа (48) — патозооспермия. В каждой группе оценивалась связываемость сперматозоидов с гиалуронаном с помощью HBA-теста.

Средний возраст мужчин в 1-й и 2-й группах составил 34,6±1,1 и 34,2±0,87 года соответственно. Среднее количество сперматозоидов в 1 мл эякулята — 76,7±7,26 и 32,3±6,39 млн соответственно, подвижность сперматозоидов — 54,7±1,78 и 32,4±4,00%. При анализе значений HBA-теста в сравниваемых группах были получены статистически значимые различия — 73,3±3,04 и 61,4±4,79% соответственно ($p \leqslant 0,05$).

Эти данные согласуются с результатами исследований последних лет. Установлено, что по крайней мере три гиалуронансвязывающих белка вовлечены в созревание и подвижность сперматозоида, его гиалуронидазную активность и связывание с *zona pellucida*, акросомную реакцию [7, 9]. Отмечено, что процент клеток с нормальной морфологией, хорошей конденсацией хроматина и способностью связываться с прозрачной оболочкой выше во фракции сперматозоидов, способных преодолевать кумулюс [19]. У гиалуронансвязывающих сперматозоидов каспаза-3, маркер апоптоза и фрагментации ДНК, не обнаруживается. Однако наиболее существенным

***Таблица 1*. Концентрация сперматозоидов в группах с различным значением HBA-теста**

	Значение HBA-теста							
	>85%	<85%	>80%	<80%	>75%	<75%	>70%	<70%
Концентрация сперматозоидов, млн/мл ($X\pm m$)	87,1±9,94	54,0±5,85	82,4±8,13	45,2±5,51	78,1±7,36	44,3±6,20	75,1±6,89	42,6±6,65
Разница, %	38**		45,1**		43,3**		43,3**	
	Значение HBA-теста							
	>65%	<65%	>60%	<60%	>55%	<55%	>50%	<50%
Концентрация сперматозоидов, млн/мл ($X\pm m$)	72,9±6,50	40,9±7,25	73,3±6,37	37,1±6,46	69,5±6,12	40,6±7,86	67,8±5,85	43,7±10,48
Разница, %	43,9**		49,4**		41,6**		35,5	

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: * — $p\leqslant 0{,}05$; ** — $p\leqslant 0{,}01$.

***Таблица 2*. Прогрессивная подвижность сперматозоидов в группах с различным значением HBA-теста**

	Значение HBA-теста							
	>85%	<85%	>80%	<80%	>75%	<75%	>70%	<70%
Прогрессивно подвижные сперматозоиды, % ($X\pm m$)	58,1±2,85	44,2±2,41	55,2±2,22	42,2±3,04	54,2±2,03	41,2±3,48	54,6±1,98	37,9±3,60
Разница, %	23,9**		23,5**		24**		30,6**	
	Значение HBA-теста							
	>65%	<65%	>60%	<60%	>55%	<55%	>50%	<50%
Прогрессивно подвижные сперматозоиды, % ($X\pm m$)	52,9±2,12	38,3±3,85	52,3±2,15	38,5±3,93	50,4±2,26	41,6±4,04	50,3±2,14	37,8±3,98
Разница, %	27,6**		26,4**		17,5		24,9*	

***Таблица 3*. Морфология сперматозоидов в группах с различным значением HBA-теста**

	Значение HBA-теста							
	>85%	<85%	>80%	<80%	>75%	<75%	>70%	<70%
Морфологически нормальные сперматозоиды, % ($X\pm m$)	7,8±1,19	5,3±0,53	7,6±0,95	4,3±1,06	7,2±0,91	4,3±1,15	7,6±0,98	3,0±0,56
Разница, %	32,1		43,4*		40,3		60,1**	
	Значение HBA-теста							
	>65%	<65%	>60%	<60%	>55%	<55%	>50%	<50%
Морфологически нормальные сперматозоиды, % ($X\pm m$)	7,1±0,70	3,1±0,48	7,1±0,92	2,8±0,62	6,9±0,92	3,0±0,63	6,7±0,84	2,7±0,27
Разница, %	56,3**		60,6**		56,5**		59**	

является снижение частоты хромосомных анеуплоидий у гиалуронансвязывающих сперматозоидов по сравнению с гиалуронаннесвязывающими сперматозоидами [5]. По-видимому, существует корреляция между высоким уровнем активности мембранных рецепторов, имеющих гиалуронидазную активность, и существенной экспрессией белков теплового шока, которые обеспечивают транспорт ферментов репарации ДНК для снижения ее повреждения.

Наши данные указывают на значительное снижение уровня HBA в группе с патозооспермией, что может косвенно свидетельствовать о нарушениях процессов ремоделирования рецепторного аппарата сперматозоидов, увеличения уровня фрагментации ДНК и анеуплоидий.

Таким образом, согласно полученным данным, рекомендовано проведение HBA-теста пациентам с патозооспермией для исключения возможных рисков при проведении программы ВРТ.

В настоящее время данные литературы о корреляции между показателями семиологического анализа и значением HBA-теста малочисленны и противоречивы.

Поскольку HBA-тест не является скрининговым тестом перед вступлением пары в программу ЭКО/ИКСИ, то перед нами стояла задача определить возможные предикторные значения спермограммы, когда HBA-тест может быть рекомендован для проведения.

По результатам HBA-теста пациенты были разделены на несколько групп. К 1-й группе были отнесены пациенты, у которых связывание с гиалуронаном было >85% и <85%. Следующие 7 групп имели значения HBA-теста по нисходящей на 5% **(табл. 1—3)**. Последняя группа со значениями >50% и <50% была рубежной в нашем исследовании. Это обусловлено малым количеством пациентов со значениями HBA-теста существенно <50% и невозможностью проведения статистического анализа.

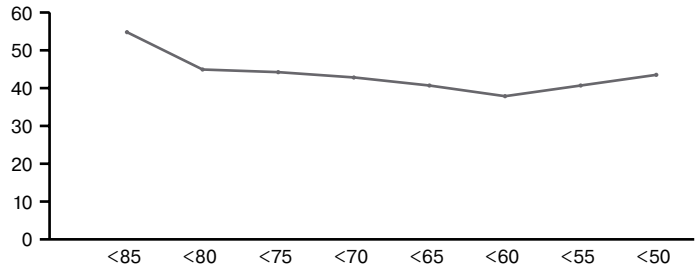

Рис. 1. **Процентные соотношения концентрации сперматозоидов (по оси ординат) и значений HBA-теста (по оси абсцисс).**

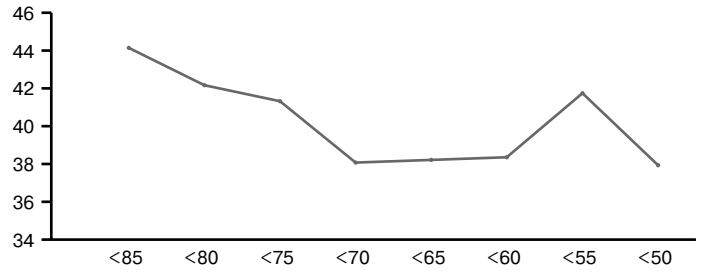

Рис. 2. **Процентные соотношения прогрессивной подвижности сперматозоидов (по оси ординат) и значений HBA-теста (по оси абсцисс).**

Анализ концентрации сперматозоидов в группах с различным значением HBA-теста показал статистически значимые различия ($p \leqslant 0,05$, $p \leqslant 0,01$) концентрации сперматозоидов в 1 мл нативного эякулята **(см. табл. 1)**. Разница в содержании сперматозоидов в группе была от 35,5 до 49,4%. На **рис. 1** отмечается последовательное снижение значений как HBA-теста с 85 до <65%, так и концентрации сперматозоидов с 54 до 41 млн/мл. Дальнейшее снижение значений HBA-теста не приводило к заметному уменьшению концентрации сперматозоидов. Коэффициент корреляции (r) был равен 0,325 (при $t=3,03$; $p \leqslant 0,05$). Исходя из поставленной задачи нашего исследования, возможным предикторным значением для назначения HBA-теста является концентрация сперматозоидов ⩽41 млн/мл.

Сравнение результатов подвижности сперматозоидов с данными HBA-теста в группах исследования демонстрирует статистически значимые различия ($p \leqslant 0,05$, $p \leqslant 0,01$); минимальная разница значений по подвижности в группе составила 17,5%, а максимальная — 30,6% **(см. табл. 2)**. На **рис. 2** отмечается последовательное снижение значений HBA-теста с 85 до <70% и содержания прогрессивно подвижных сперматозоидов с 44 до 38%. Далее на **рис. 2** отмечается плато со статистически незначимым подъемом. Степень связи между подвижностью и величиной связывания с гиалуронаном был 0,332 (при $t=3,1$; $p \leqslant 0,05$). При прогрессивной подвижности сперматозоидов ⩽38%, по нашим данным, рекомендуется выполнение HBA-теста.

Морфологический анализ сперматозоидов в группах с различным значением HBA-теста показал статистически значимые различия ($p \leqslant 0,05$, $p \leqslant 0,01$) в группах сравнения **(см. табл. 3)**. Разница значений в группе колебалась от 32,1 до 60,6%. На **рис. 3** очевидно снижение значений как HBA-теста с 85 до <70%, так и содержания морфологически нормальных сперматозоидов с 5 до 3%. **Рис. 2** показывает, что, начиная со значения HBA-теста <70% не происходит дальнейшего снижения значений морфологически нормальных сперматозоидов, а $r=0,332$ (при $t=2,66$; $p \leqslant 0,05$). Таким образом, возможным предикторным значением для выполнения HBA-теста является содержание морфологически нормальных сперматозоидов ⩽3%.

Таким образом, наши данные демонстрируют умеренную статистически достоверную положительную корреляцию между значениями HBA-теста и основными показателями спермограммы: концентрацией, подвижностью и морфологией. Сходные закономерности опубликованы в работе [20, 21].

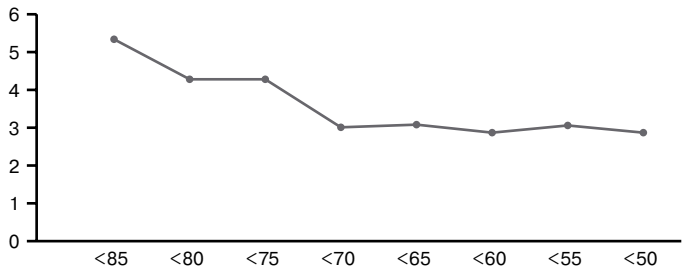

Рис. 3. **Процентные соотношения морфологически нормальных сперматозоидов (по оси ординат) и значений HBA-теста (по оси абсцисс).**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам исследования, предикторными значениями спермограммы для проведения HBA-теста являются концентрация ⩽41 млн/мл, подвижность ⩽38%, морфология ⩽3%. Назначение дополнительного анализа на связывание с гиалуронаном тем пациентам, у которых значения спермограммы равны или ниже предикторных показателей, возможно, поможет выявить пациентов с плохим репродуктивным прогнозом и увеличить количество благоприятных клинических исходов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация об источнике финансирования: ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России.

ЛИТЕРАТУРА

1. Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003;100:4869-4874.
   doi: 10.1073/pnas.2136654100
2. Russell D, Salustri A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. *Semin Reprod Med.* 2006;24(4):217-227.
   doi: 10.1055/s-2006-948551
3. Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biology of Reproduction.* 1995;53:1280-1285.
   doi: 10.1095/biolreprod53.6.1280
4. Petersen CG, Massaro FC, Mauri AL, Oliveira JBA, Baruffi RLR, Franco JG. Efficacy of hyaluronic acid binding assay in selecting motile spermatozoa with normal morphology at high magnification. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2010;8:149.
   doi: 10.1186/1477-7827-8-149
5. Worrilow KC, Woodhouse ES, Perloe M, Smith S, Witmyer J, Ivani K, Khoury C, Ball GD, Elliot T, Lieberman J. Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI): significant improvement in clinical outcomes—multicenter, double-blinded and randomized controlled trial. *Human Reproduction.* 2013;28(2):306-314.
   doi: 10.1093/humrep/des417
6. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril.* 2003;79(Suppl 3):1616-1624.
   doi: 10.1016/s0015-0282(03)00402-3
7. Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod.* 1997;56:1020-1024.
   doi: 10.1095/biolreprod56.4.1020
8. Ranganathan S, Ganguly AK, Datta K. Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function. *Molecular Reproduction and Development.* 1994;38:69-76.
   doi: 10.1002/mrd.1080380112
9. Hunnicutt GR, Mahan K, Lathrop WF, et al. Structural relationship of sperm soluble hyaluronidase to the sperm membrane protein PH-20. *Biol Reprod.* 1996;54(6):1343-1349.
   doi: 10.1095/biolreprod54.6.1343
10. Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, et al. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol.* 1994;125(5):1157-1163.
    doi: 10.1083/jcb.125.5.1157
11. Meyers SA, Yudin AI, Cherr GN, VandeVoort CA, Myles DG, Primakoff P, Overstreet JW. Hyaluronidase activity of macaque sperm assessed by an in vitro cumulus penetration assay. *Mol Reprod Dev.* 1997;46(3):392-394.
    doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199703)46:3<392::AID-MRD19>3.0.CO;2-0
12. Dandekar P, Talbot P. Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization. *Mol Reprod Dev.* 1992;31(2):135-143.

doi: 10.1002/mrd.1080310208

13. Prudence Talbot Hyaluronidase dissolves a component in the hamster zona pellucida. *Journal of Experimental Zoology*. 1984;229(2):309-316.

    doi: 10.1002/jez.1402290216

14. Yudin AI, Li MW, Robertson KR, Cherr GN, Overstreet JW. Characterization of the active site of monkey sperm hyaluronidase. *Reproduction*. 2001;121(5):735-743.

    doi: 10.1530/rep.0.1210735

15. Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, John Aitken R. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *Journal of Cell Science*. 2004;117:3645-3657.

    doi: 10.1242/jcs.01214

16. Dun MD, Smith ND, Baker MA, et al. The chaperonin containing TCP1 complex (CCT/TRiC) is involved in mediating sperm-oocyte interaction. *J Biol Chem*. 2011;286(42):36875-36887.

    doi: 10.1074/jbc.M110.188888

17. Nixon B, Mitchell LA, Anderson AL, Mclaughlin EA, O'bryan MK, Aitken RJ. Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes. *J Cell Physiol*. 2011;226(10):2651-2665.

    doi: 10.1002/jcp.22615

18. Redgrove KA, Anderson AL, Dun MD, McLaughlin EA, O'Bryan MK, Aitken RJ, Nixon B. Involvement of multimeric protein complexes in mediating the capacitation-dependent binding of human spermatozoa to homologous zonae pellucidae. *Developmental Biology*. 2011;356(2):460-474.

    doi: 10.1016/j.ydbio.2011.05.674

19. Franken DR, Bastiaan HS. Can a cumulus cell complex be used to select spermatozoa for assisted reproduction? *Andrologia*. 2009;41:369-376.

    doi: 10.1111/j.1439-0272.2009.00938.x

20. Hong Ye, Guo-ning Huang, Yang Gao, De Yi Liu. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. *Human Reproduction*. 2006;21(6):1545-1550.

    doi: 10.1093/humrep/del008

21. Yildirim M, Duvan CI, Pekel A, Ayrim A, Kafali H. Can Hyaluronan Binding Assay Predict the Outcome of Intrauterine Insemination in Couples with Unexplained or Mild Male Factor Infertility? *J Reprod Infertil*. 2015;16(1):18-23.

    PMCID: PMC4322176