

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.08.094>

УДК 612.616.2:612.014.48

**А.В. Клепко, Л.В. Горбань,
О.А. Мотрина, Л.В. Саковська, С.В. Андрейченко**

ДУ “Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України”, Київ

E-mail: alla.klepko@gmail.com

Морфофункціональні особливості сперми чоловіків, які мешкають на радіоактивно забруднених територіях України

Представлено членом-кореспондентом НАН України В.Ф. Сагачем

За даними рандомізованих досліджень якості сперми чоловіків, які проживають в Києві, Житомирській, Київській, Івано-Франківській та Полтавській областях з радіоактивною забрудненістю територій в межах 20–550 кБк/м², встановлено статистично достовірні регіональні відмінності за фізіологічними та морфологічними ознаками сперматозоїдів. Серед донорів сперми, що мешкають в регіонах з підвищеною радіоактивною забрудненістю ґрунтів, виявлено збільшення частоти появи олігозооспермії, тератозооспермії та астенозооспермії, а також зростання індексу аномальності, рН та часу розрідження сперми.

Ключові слова: сперма, сперматозоїди, радіоактивне забруднення, олігозооспермія, астенозооспермія, тератозооспермія.

За даними Держкомстату, більшість чоловічого населення України проживає в регіонах, що зазнали радіоактивного та/або хімічного забруднення як внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС чи інших техногенних катастроф локального масштабу, так і в результаті зростання антропогенних навантажень на навколишнє середовище. За таких умов значно зростають ризики зовнішнього негативного впливу на чоловічу статеву систему, яка завдяки притаманній їй підвищеній проліферативній активності характеризується високою чутливістю до молекулярних та субклітинних пошкоджень [1, 2].

Як відомо, сперма людини складається із сперматозоїдів та сім'яної рідини, за рахунок якої утворюється 90 % еякуляту. Сім'яна рідина являє собою те поживне середовище, в якому містяться сперматозоїди, а також інколи лейкоцити та “округлі” клітини сперматогенного епітелію. Сперма є об'єднаним продуктом метаболізму яєчок, епідидимісів, передміхурової залози, сім'яних пухирців, а також купферових залоз [3]. Тому пошкодження будь-якої ланки цього складного фізіологічного ланцюга може спричинити виникнення патологічних змін у сперматозоїдах і сім'яній рідині.

© А.В. Клепко, Л.В. Горбань, О.А. Мотрина, Л.В. Саковська, С.В. Андрейченко, 2017

Доведено, що пошкодження, які накопичуються протягом сперматогенезу, згодом можуть призводити до втрати фертилізаційного потенціалу сперматозоїдів та розвитку чоловічого безпліддя [3, 4].

Ми ставили за мету дослідження оцінити якість сперми та визначити фертилізаційний потенціал сперматозоїдів у зразках сперми, отриманих від чоловіків-добровольців, які проживають в Україні на радіоактивно забруднених територіях з різним вмістом Cs-137 у ґрунті.

Дослідження проводили з дотриманням умов медичної етики і за наявності письмової згоди від донорів сперми. Донори здавали сперму шляхом мастурбації у стерильну пробірку після 3–4 днів статевого утримання. Кожний еякулят витримували протягом 20–60 хв при 37 °С, щоб відбулося повне розрідження сперми. Аналіз сперми здійснювали за основними критеріями, що рекомендовані ВООЗ [5].

Зразки сперми були отримані від 223 чоловіків віком від 27 до 42 років з Житомирської, Києва та Київської, Івано-Франківської, а також Полтавської областей. Усіх донорів сперми було поділено на чотири групи, відповідно до регіонів їх проживання.

Індивідуальну еквівалентну дозу для всього тіла визначали згідно з рекомендаціями [6–8]. Колективну еквівалентну дозу в групах оцінювали шляхом підсумовування індивідуальних еквівалентних доз для осіб, що були включені до групи. Попередньо чоловіків опитували щодо строків перебування в зоні забруднення, їх професійної діяльності, середньої тривалості знаходження всередині і назовні будинків, умов життя, звичок, харчування тощо.

Життєздатність сперматозоїдів визначали за допомогою водного розчину еозину Y (1,25 %) та нігрозину (10 %). Для тестування рухливості сперматозоїдів краплю сперми розміщували в лунці на предметному скельці, прогрівали на термостатованому столику при 37 °С та продивлялися під світловим мікроскопом на збільшенні $\times 400$. Для визначення загальної рухливості сперматозоїдів навмання відбирали по 200 сперматозоїдів у кожній з двох повторностей від одного зразка. Сперматозоїди вважали рухливими, якщо вони могли переміщуватись або хоча б здійснювати коливальні рухи хвостом.

За кінетичними характеристиками сперматозоїди поділяли на чотири категорії. До категорії А відносили швидкі рухливі сперматозоїди, що рухалися прямолінійно; до категорії В – сперматозоїди з поступальним рухом, що повільно пересувалися в просторі як прямолінійно, так і криволінійно; до категорії С – сперматозоїди, що не пересувалися в просторі; до категорії Д – нерухомі сперматозоїди.

Концентрацію сперматозоїдів оцінювали за допомогою камери Горяєва. Аналогічно визначали вміст лейкоцитів у спермі після забарвлення зразків *орто*-толуїдином на присутність пероксидазної активності.

Морфологічні особливості сперматозоїдів оцінювали після фарбування мазків гематоксиліном за Папаніколау. Індекс аномальності сперми визначали як співвідношення всіх помічених морфологічних дефектів у анатомічній будові проаналізованих сперматозоїдів до загальної кількості цих сперматозоїдів.

Астенозооспермія характеризувала стан сперми, коли в зразку було помічено менше, ніж 50 % поступально рухливих сперматозоїдів (А + В), причому чисельність категорії А становила менше 25 % загальної кількості сперматозоїдів. Олігозооспермія визначалась як стан, коли концентрація сперматозоїдів у 1 мл еякуляту була не більше $20 \cdot 10^6$ клітин.

Тератозооспермія характеризувала наявність у зразку сперми менше ніж 30 % морфологічно нормальних сперматозоїдів.

Порівняння даних для різних груп донорів проводили із застосуванням дисперсійного аналізу "ANOVA" та непарного тесту Стьюдента з поправкою Бонфероні. Довірчі інтервали для середніх значень ($M \pm m$) визначали за допомогою t -критерію при $p = 0,95$ на підставі підрахунку стандартної похибки. Основу статистичної обробки складали двобічні криві розподілу випадкових даних. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$ [9].

У групу донорів сперми № 1 з Житомирської області ввійшло 62 чоловіки, з яких 10 були з сільської, а 52 — з міської місцевості. Рівень радіоактивного забруднення цього регіону становив 20—550 кБк/м². Загалом накопичена групова колективна доза донорів дорівнювала 0,61 людино-Зв, середня індивідуальна еквівалентна доза — 9,87 мЗв, середній вік чоловіків становив $33,5 \pm 0,7$ року.

Група донорів сперми № 2 з Київського регіону, куди входили Київ та Київська область, складала 50 осіб, 7 з яких мешкали в сільській місцевості, а 43 — у міській зоні. Рівень радіоактивного забруднення територій тут знаходився в межах 20—185 кБк/м². Колективна доза для цієї групи донорів дорівнювала 0,24 людино-Зв, середня індивідуальна еквівалентна доза — 4,86 мЗв, середній вік чоловіків становив $32,7 \pm 0,5$ року.

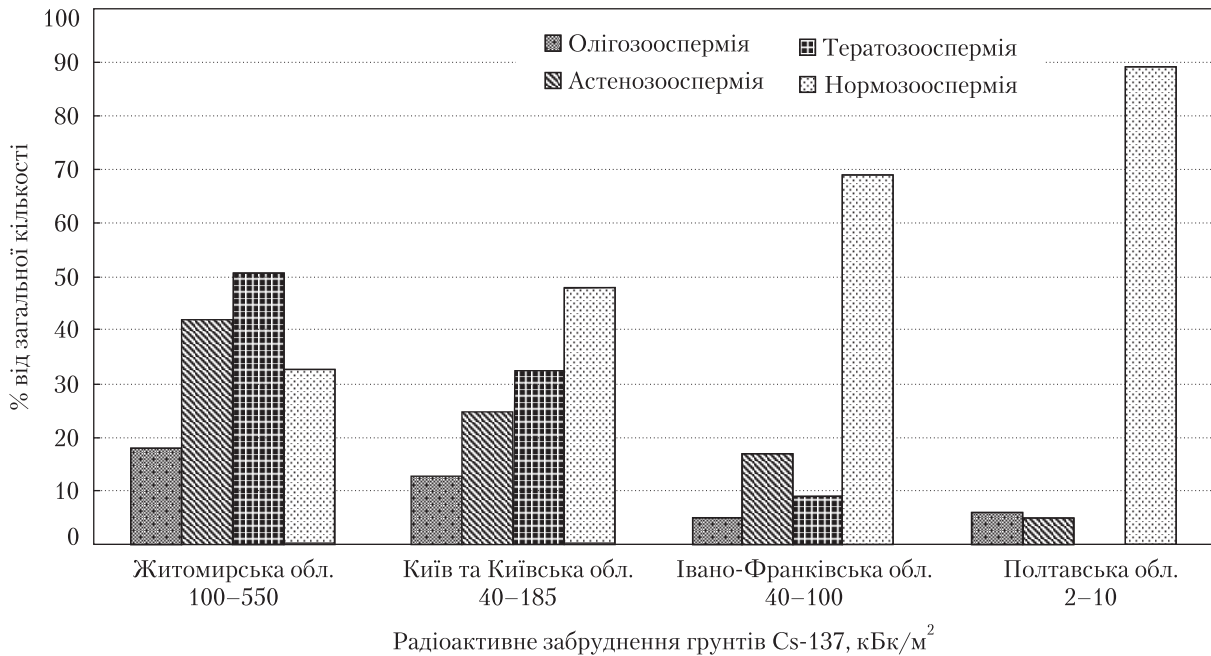
До групи № 3 входили 58 чоловіків з Івано-Франківської області, 13 з яких мешкали в селах, а інші — в містах. Радіоактивна забрудненість цих територій була в межах 40—100 кБк/м². Колективна доза дорівнювала 0,08 людино-Зв, середня індивідуальна еквівалентна доза — 1,32 мЗв, середній вік донорів становив $32,9 \pm 0,5$ року.

Група донорів сперми № 4 з Полтавського регіону включала 53 особи, 8 з яких мешкали в сільській місцевості, а решта — у місті. Усі чоловіки проживали на територіях з радіаційним забрудненням 2—10 кБк/м². Групова колективна доза в цьому варіанті дорівнювала 0,01 людино-Зв, середня індивідуальна еквівалентна доза — 0,20 мЗв, середній вік чоловіків становив $32,2 \pm 0,4$ року.

Дані стосовно фізіологічних параметрів еякуляту та якості сперми в різних групах донорів сперми наведено в таблиці. Як бачимо, найбільше середнє значення об'єму еякуляту властиве чоловікам з Полтавської області, а найменше — мешканцям Житомирської області. Група 2 за цим показником статистично не відрізнялася від групи 3 та 4, хоча мала відмінності з групою 1.

Оскільки, як відомо, найбільший внесок у формування сім'яної рідини та, відповідно, об'єму еякуляту роблять сім'яні пухирці разом з передміхуровою залозою [3], то слід припустити, що у чоловіків з груп 2, 3 та 4 ці допоміжні статеві залози функціонували значно краще, ніж у групі 1.

Як правило, при 37 °С розрідження сперми здійснюється приблизно за 20 хв. У цей період відбувається активація протеазних ферментів еякуляту, які поступово трансформують інертну молекулу простатоспецифічного антигену (ПСА) в активну форму завдовжки в 237 амінокислотних залишків, відокремлюючи від неї інертні поліпептидні шматки. Саме ПСА згодом зумовлює деградацію колоїдного матриксу еякуляту, тим самим сприяючи набуттю поступальної рухливості сперматозоїдами [3]. Найшвидше повне розрідження сперми відбувалося в групі 4, а повільніше — в групі 1, що також говорить на користь попередньо висунутої думки про деякі негаразди з функціонуванням сім'яних пухирців та



Частота виникнення різних патологічних станів сперми залежно від радіоактивної забрудненості регіону проживання чоловіків-донорів сперми

Аналіз фізіологічних властивостей еякуляту та якості сперми у чоловіків з різних регіонів України

Параметр	Середнє значення параметра ($M \pm m$)			
	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4
Об'єм еякуляту, мл	2,1 ± 0,7 ^{#&†}	3,5 ± 0,6 [*]	3,4 ± 0,3 [*]	4,2 ± 0,8 [*]
Час розрідження еякуляту, хв	45 ± 11 [†]	38 ± 14	30 ± 7	27 ± 6 [*]
pH сперми, у.о.	7,6 ± 0,2	7,9 ± 0,1 ^{&†}	7,2 ± 0,2 [#]	7,3 ± 0,1 [#]
Концентрація сперматозоїдів в еякуляті, · 10 ⁶ , сперматозоїдів/мл	45 ± 35 [†]	69 ± 21	74 ± 25	98 ± 16 [*]
Сперматозоїди зі швидким прямолінійним рухом, категорія А, %	17 ± 6 ^{&†}	27 ± 7	30 ± 11 [*]	39 ± 13 [*]
Сперматозоїди з поступальним рухом, категорія А+В, %	42 ± 10 [†]	61 ± 12	54 ± 15	68 ± 14 [*]
Концентрація лейкоцитів у спермі, клітини/мл	(225 ± 65) · 10 ³ ^{#&†}	(397 ± 43) · 10 ² ^{*&†}	(802 ± 41) · 10 ^{**#}	(285 ± 36) · 10 ^{**&}
Індекс аномальності сперматозоїдів, у.о	1,52 ± 0,28 ^{&†}	1,14 ± 0,23 ^{&†}	0,68 ± 0,15 ^{*#}	0,32 ± 0,11 ^{*#}

Примітка. Відмінності статистично достовірні ($p \leq 0,05$) порівняно з показниками групи 1 (*), 2 (#), 3 (&), 4 (†); у.о.

передміхурової залози у чоловіків групи 1 порівняно з іншими групами. Тут слід згадати, що ультразвукове обстеження учасників ліквідації аварії на ЧАЕС через 10 років після катастрофи виявило в них специфічні ушкодження простати і сім'яних пухирців, подібні до тих, що виникають при хронічному везикуліті та простатиті [10]. Як свідчать одержані дані (див. таблицю), вміст лейкоцитів у спермі чоловіків з групи 1 був значно вищий, ніж з груп 2, 3 та 4, хоча і в межах норми ($<10^6$ кл./мл), що може бути як наслідком хронічного запалення, так і результатом послаблення гематотестикулярного бар'єру, яке спостерігається під дією хронічного опромінення іонізуючою радіацією [11], оскільки у донорів сперми не було виявлено будь-яких інфекційних захворювань сечостатевої системи.

Аналіз життєздатності сперматозоїдів не виявив будь-яких розбіжностей за цим показником між групами донорів сперми. Однак подальший розгляд кінетичних характеристик сперматозоїдів показав істотне уповільнення поступального руху сперматозоїдів у багатьох зразках сперми чоловіків з групи 1 за межі встановлених лімітів [5]. Натомість, вказаним критеріям відповідала переважна більшість зразків сперми донорів 2, 3 та 4 груп. До того ж у чоловіків з групи 1 у зразках сперми виявлено максимальну кількість сперматозоїдів категорії С – 20 %. За даними мікроскопічного аналізу морфологічних ознак встановлено наявність дефектних сперматозоїдів у зразках сперми чоловіків усіх чотирьох груп, але в групі 1 їх вміст був максимальним, а в групі 4 – найменшим, що достовірно відрізнявся від аналогічних показників перших двох груп.

Серед структурних дефектів сперматозоїдів, що превалювали в зразках сперми чоловіків групи 1, слід відзначити пошкоджені голівки, зруйновані акросоми та вакуолізовані акросоми. Також відмічено багато поламаних хвостів і надмірної цитоплазми в області шийки. В результаті індекс аномальності сперми в цій групі сягнув середнього значення в 1,52 у. о. В групі 2 головним чином спостерігалися пошкоджені голівки та акросомні дефекти, рівень яких перевищував показники групи 1. У значно меншій кількості тут виявлені поламані хвости та цитоплазматичні краплини на поверхні сперматозоїдів. Індекс аномальності сперми в групі 2 був меншим, ніж у групі 1 (1,14 у. о.), але не на статистично достовірному рівні. В групах 3 та 4 також спостерігалися зруйновані акросоми, поламані хвости, вакуолізовані акросоми та цитоплазматичні краплинки, але в набагато меншій кількості, ніж у групах 1 та 2. Середній індекс аномальності сперми в групі 4 був майже в 2; 3,5 і 4,5 рази менший, ніж у групах 3, 2 та 1 відповідно. Тут слід також згадати про те, що показник рН еякуляту в групах 1 та 2 збільшився порівняно з групами 3 та 4. Проте лужне середовище, як правило, зумовлює появу спонтанної акросомної реакції та руйнування акросом [12].

Аналіз індивідуальних спермограм показав (рисунок), що патологічний стан сперми у чоловіків Житомирського регіону зустрічався з імовірністю в 69 %, Київського – 52 %, Івано-Франківського – 31 % та Полтавського – 11 %.

Зазначимо, що на підставі результатів попереднього аналізу анамнезу, шкідливих звичок і способу життя добровольців та їх зовнішнього медичного обстеження до участі в дослідженнях не були допущені ті чоловіки, які зазнали істотного впливу чинників нерадіаційного походження, що згодом могло позначитись на якості їх сперми та кінцевих результатах дослідження [13–15].

Таким чином, проведені дослідження показали існування зворотної залежності між якістю сперми й індивідуальною еквівалентною дозою, накопиченою донорами сперми, що

проявлялося в пригніченні поступального руху та іммобілізації сперматозоїдів, зменшенні їх концентрації, втраті життєздатності, а також зростанні загального індексу аномальності сперматозоїдів в еякуляті. При цьому збільшення індивідуальних дозових навантажень на чоловіків-донорів сперми зумовлювало зменшення об'єму еякуляту, підвищення його рН та зростання часу розрідження сперми. Через це тривале проживання на радіоактивно забруднених територіях сприяло появі олігозооспермії, астенозооспермії та тератозооспермії.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Jacquet P. Sensitivity of germ cells and embryos to ionizing radiation. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2004. **18**. P. 106–114.
2. Fischbein A., Zabudovsky N., Eltes F. Ultramorphological sperm characteristics in the risk assessment of health effects after radiation exposure among salvage workers in Chernobyl. *Environ. Health Perspect.* 1997. **105**. P. 33–44.
3. Neischlag E., Behre H.M., Neischlag S. *Andrology. Male reproductive health and dysfunction*. 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. 85 p.
4. Haines G.A., Hendry J.H., Daniel C.P., Morris I.D. Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation. *Biol. Reprod.* 2002. **67**. P.854–861.
5. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 4th ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1999. 188 p.
6. The 2007 Recommendation of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. *Ann ICRP*. 2007. **37**, № 2–4. P. 1–332.
7. Моисеев А.А., Иванов В.И. Справочник по дозиметрии и радиационной гигиене. 4-е изд., перераб. и доп. Москва: Энергоатомиздат, 1990. 252 с.
8. Malko M.V. Doses of the whole body irradiation in Belarus as a result of the Chernobyl accident. *Many-sided approach to the realities of the Chernobyl NPP accident*. Kyoto University, Japan. KURRI-KR-21. 2008. P. 136–146.
9. Bland M. *An introduction to medical statistics*. 3rd ed. Oxford: Oxford Univ. Press, 2007. 405 p.
10. Evdokimov V.V., Erasova V.I., Demin A.I., Dubinina E.B., Liubchenko P.N. State of the reproductive system of men who participated in the cleaning-up of aftereffects of the Chernobyl AES accident. *Med. Tr. Prom Ekol.* 1993. № 3–4. P. 25–26.
11. Hoyes K.P., Morris I.D. Environmental radiation and male reproduction. *Int. J. Androl.* 1996. **19**. P. 199–204.
12. Tulsiani D.R.P., Abou-Haila A., Loeser C.R., Pereira B.M.J. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp. Cell Res.* 1998. **240**. P. 151–164.
13. Sharma R., Beidenharn K.R., Fedor J.M., Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod. Biol. Endocrin.* 2013. **11**. P. 66–81.
14. Wong W.Y., Zielhuis G.A., Thomas C.M., Merkus H.M., Steegers-Theunissen R.P. New evidence of the influence of exogenous and endogenous factors on sperm count in man. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2003. **110**. P. 49–54.
15. Sharp R.M. Lifestyle and environmental contribution to male infertility. *Br. Med. Bull.* 2000. **56**. P. 630–642.

Надійшло до редакції 25.04.2017

REFERENCES

1. Jacquet, P. (2004). Sensitivity of germ cells and embryos to ionizing radiation. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 18, pp. 106-114.
2. Fischbein, A., Zabudovsky, N. & Eltes, F. (1997). Ultramorphological sperm characteristics in the risk assessment of health effects after radiation exposure among salvage workers in Chernobyl. *Environ. Health Perspect.*, 105, pp. 33-44.

3. Neischlag, E., Behre, H. M. & Neischlag, S. (2010). *Andrology. Male reproductive health and dysfunction*, 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer.
4. Haines, G. A., Hendry, J. H., Daniel, C. P. & Morris, I. D. (2002). Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation. *Biol. Reprod.*, 67, pp. 854-861.
5. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 4th ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1999.
6. ICRP. (2007). The 2007 Recommendation of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. *Ann ICRP*, 37, No. 2-4, pp. 1-332.
7. Moiseev, A. A. & Ivanov, V. I. (1990). *Handbook of dosimetry and radiation hygiene*. 4th ed. Moscow: Energoatomizdat (in Russian).
8. Malko, M. V. (2008). Doses of the whole body irradiation in Belarus as a result of the Chernobyl accident. In *Many-sided approach to the realities of the Chernobyl NPP accident* (pp. 136-146), Kyoto University, Japan. KURRI-KR-21.
9. Bland, M. (2007). *An introduction to medical statistics*. 3rd ed. Oxford: Oxford Univ. Press.
10. Evdokimov, V. V., Erasova, V. I., Demin, A. I., Dubinina, E. B. & Liubchenko, P. N. (1993). State of the reproductive system of men who participated in the cleaning-up of aftereffects of the Chernobyl AES accident. *Med. Tr. Prom Ekol.*, No. 3-4, pp. 25-26.
11. Hoyes, K. P. & Morris, I. D. (1996). Environmental radiation and male reproduction. *Int. J. Androl.*, 19, pp. 199-204.
12. Tulsiani, D. R. P., Abou-Haila, A., Loeser, C. R. & Pereira, B. M. J. (1998). The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp. Cell Res.*, 240, pp. 151-164.
13. Sharma, R., Beidenharn, K. R., Fedor, J. M. & Agarwal, A. (2013). Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod. Biol. Endocrin.*, 11, pp. 66-81.
14. Wong, W. Y., Zielhuis, G. A., Thomas, C. M., Merkus, H. M. & Steegers-Theunissen, R. P. (2003). New evidence of the influence of exogenous and endogenous factors on sperm count in man. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 110, pp. 49-54.
15. Sharp, R. M. (2000). Lifestyle and environmental contribution to male infertility. *Br. Med. Bull.*, 56, pp. 630-642.

Received 25.04.2017

*А.В. Клепко, Л.В. Горбань, О.А. Мотрина,
Л.В. Саковская, С.В. Андрейченко*

ГУ “Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины”, Киев
E-mail: alla.klepko@gmail.com

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СПЕРМЫ МУЖЧИН, КОТОРЫЕ ПРОЖИВАЮТ НА РАДИОАКТИВНО ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ УКРАИНЫ

В результате рандомизированных исследований качества спермы мужчин, которые проживают в Киеве, Житомирской, Киевской, Ивано-Франковской и Полтавской областях с радиоактивной загрязненностью территорий в пределах 20–550 кБк/м², установлены статистически достоверные региональные отличия по физиологическим и морфологическим признакам сперматозоидов. Среди доноров спермы, которые проживают в регионах с повышенной радиоактивной загрязненностью почв, выявлено увеличение частоты возникновения олигозооспермии, тератозооспермии и астенозооспермии, а также рост индекса аномальности, рН и времени разжижения спермы.

Ключевые слова: сперма, сперматозоиды, радиоактивное загрязнение, олигозооспермия, астенозооспермия, тератозооспермия.

*A.V. Klepko, L.V. Gorban, O.A. Motryna,
L.V. Sakovska, S.V. Andreychenko*

National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine, Kiev
E-mail: alla.klepko@gmail.com

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL PECULIARITIES
OF HUMAN SPERM FROM INHABITANTS
OF RADIATION-POLLUTED TERRITORIES OF UKRAINE

Cross-sectional analysis of the sperm quality was done in 4 groups of men from Zhytomyr, Kyiv, Ivano-Frankivsk, and Poltava regions, respectively, with radiation pollution territories in the range 20-550 kBq/m². The research has elucidated the existence of correlation links between the accumulated dose of external irradiation, on the one hand, and the growth of the index of sperm deformity, pH, and the time of sperm liquefaction, on the other hand. In addition, the sperm concentration and the progressive motility are shown to decline. The long-term residence of human males on the radiation-polluted territories has been shown to result in different sperm pathologic states, namely asthenozoospermia, oligozoospermia, and teratozoospermia.

Keywords: *sperm, spermatozoa, radiation pollution, oligozoospermia, asthenozoospermia, teratozoospermia.*