*JÓZEF CHMIEL, TADEUSZ RUCKI, KRYSTYNA SOCHACKA, GRAŻYNA HADUCH*

# BADANIA NAD ZAWARTOŚCIĄ KWASU DEZOKSYRYBONUKLEINOWEGO (DNA) W PLEMNIKACH LUDZKICH

Z Zakładu Biochemii Instytutu Chemii i Analityki AM w Poznaniu
Kierownik: prof. dr med. *J. Chmiel*
i z Zakładu Andrologii i Seminologii Instytutu Ginekologii i Położnictwa AM w Poznaniu
Kierownik: doc. dr *T. Rucki*

*Przeprowadzono oznaczenia zawartości DNA w plemnikach prawidłowych, z próbek nasienia zakwalifikowanych do normospermii. Następnie badano zawartość DNA w próbkach nasienia czterech grup seminologicznych o obniżonej zdolności płodnej: asthenospermii, asthenoteratospermii, oligoasthenospermii i oligoasthenoteratospermii.*

*Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono związek między zawartością DNA w plemnikach a wartością biologiczną nasienia.*

Badania nad zawartością kwasu dezoksyrybonukleinowego w plemnikach zapoczątkowane przez *Mieschera* w 1878 r. (6) są nieustannym przedmiotem zainteresowań wielu specjalności medycznych (1, 5, 9, 10).

W ostatnich latach pojawiły się prace doświadczalne dotyczące zawartości DNA w plemnikach zwierząt gospodarskich (4, 8), a także pierwsze doniesienia na temat ilościowych oznaczeń DNA w prawidłowym plemniku ludzkim (3, 11). W doświadczeniach na zwierzętach wykazano, że niektóre przypadki bezpłodności stoją w określonym związku z nieprawidłową zawartością dezoksyrybonukleoproteidów w plemnikach (7).

Założeniem niniejszej pracy było ustalenie zakresu fizjologicznej zawartości DNA w plemnikach ludzkich w próbkach nasienia kwalifikowanych jako normospermia, a następnie zbadanie zawartości DNA w próbkach nasienia o obniżonej zdolności do zapłodnienia.

Przeprowadzono 125 oznaczeń zawartości DNA w próbkach nasienia należących do czterech grup seminologicznych i podjęto próbę ich statystycznego opracowania, celem znalezienia zależności między wartością DNA a wartością biologiczną nasienia.

## MATERIAŁ I METODYKA

Badania przeprowadzono na próbkach nasienia dostarczonych z Zakładu Andrologii i Seminologii Instytutu Ginekologii i Położnictwa w Poznaniu.

Spośród różnych grup seminologicznych wybrano cztery, które z racji częstości swego występowania mogły dać najbogatszy materiał doświadczalny: *asthenospermia, asthenoteratospermia, oligoasthenospermia* i *oligoasthenoteratospermia*. Rozpoznania ustalono w oparciu o podstawowe badania nasienia.

Oznaczanie zawartości DNA w plemnikach przeprowadzono wg metody Joela (3). Dwie jednakowe próbki świeżego nasienia o znanej liczbie plemników, każda o objętości 1 ml, pipetowano do probówek wirówkowych i wirowano w ciągu 15 min. z szybkością 4 500 obr/min. Supernatant odrzucano, a osad przemywano dwukrotnie

0,9% roztworem NaCl. Po ponownym odwirowaniu zlewano supernatant, a próbki poddawano działaniu 5 ml 95% etanolu. Etanolową zawiesinę odwirowywano i przemywano 5 ml 5% kwasu trójchlorooctowego (TCA) w celu usunięcia kwaso-rozpuszczalnych nukleotydów i innych rozpuszczalnych substancji, które adsorbują UV.

Po przemyciu i odwirowaniu supernatant odrzucano i do każdej probówki pipetowano ponownie 5 ml 5% kwasu trójchlorooctowego. Następnie ogrzewano probówki przez 15 min. na łaźni wodnej w temperaturze 90°C w celu przeprowadzenia kwaśnej hydrolizy DNA. Probówki oziębiano, wirowano a supernatant dekantowano przeznaczając go do oznaczeń DNA. Supernatant zawierający hydrolizat DNA w roztworze TCA umieszczano w kwarcowych kuwetach i odczytywano ekstynkcję na spektrofotometrze przy długości fali 265 nm, wobec czystego 5% TCA.

W przypadku niskiej zawartości DNA ekstynkcję odczytywano bez rozcieńczania hydrolizatu, a 5-krotnie rozcieńczenie stosowano w probówkach o normalnej lub wysokiej zawartości DNA. Wyniki odczytywano z wykresu kalibracyjnego sporządzonego dla wzorcowych stężeń DNA i wyrażano w mg DNA zawartych w 1 milionie plemników. W statystycznym opracowaniu wyników posługiwano się testem *Studenta* i *Dixona* (2). Błąd metody oznaczania DNA wynosił 2,5%.

## WYNIKI I OMÓWIENIE

Na podstawie wyników uzyskanych z 10 próbek nasienia zakwalifikowanych jako normospermia, obliczono zakresy prawidłowych zawartości DNA w 1 milionie plemników, co obrazuje tabela I.

Tabela I. Zawartość DNA w plemnikach w normospermii. Dane obliczone na podstawie 10 przebadanych przypadków

| | mg DNA/1 milion plemników |
|---|---|
| średnia ($\bar{x}$) | $0{,}34 \times 10^{-2}$ |
| odchylenie standardowe (s) | $0{,}05 \times 10^{-2}$ |
| współczynnik zmienności | 2,6% |
| wartości fizjologiczne ($x = \bar{x} \pm 2s$) | $0{,}34 \times 10^{-2}$ ($\pm 0{,}10$) |
| wartości patologiczne $\bar{x} - 3s > x > \bar{x} + 3s$ | $0.19 \times 10^{-2} > x > 0{,}49 \times 10^{-2}$ |

W oparciu o powyższe dane doświadczalne można wyliczyć teoretyczną zawartość DNA dla 1 plemnika prawidłowego. Wynosi ona $3{,}4 \times 10^{-9}$ mg. Dla porównania można przytoczyć, że wg *Younga* (11) prawidłowy plemnik zawiera $3{,}25 \times 10^{-9}$ mg DNA, a wg *Meyhofera* $2{,}96 \times 10^{-9}$ mg DNA.

Ustalone wartości dla normospermii stanowiły podstawę dla interpretowania wyników oznaczeń DNA w próbkach nasienia badanych czterech grup seminologicznych. Uzyskane wyniki z badanych 125 przypadków sklasyfikowano w ramach czterech zakresów diagnostycznych, co pozwoliło na porównanie występowania częstości wyników w poszczególnych zakresach w obrębie badanych grup seminologicznych (tabela II).

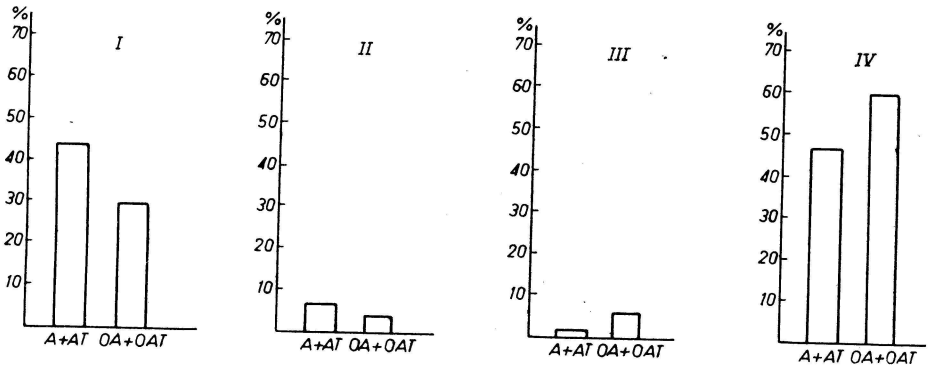
Grupy seminologiczne uszeregowano w kolejności od najmniejszej do najbardziej odbiegających od stanu fizjologicznego, biorąc pod uwagę takie parametry jak liczba plemników, przeżywalność, ruchliwość i morfologia. *Asthenospermia* to grupa, która odznacza się jedynie obniżoną ruchliwością i przeżywalnością plemników. Pod względem zawartości DNA w plemnikach grupa ta charakteryzuje się najwyższym odsetkiem przypadków w granicach normy. Dalsze trzy grupy seminologiczne charakteryzują się większymi odchyleniami w liczbie, budowie i ruchliwości plemników. Liczba przypadków o prawidłowej zawartości DNA jest w tych grupach znacznie niższa — poniżej 34,4%. Jedynie w *asthenospermii* nie

Tabela II. Częstość występowania poszczególnych zakresów zawartości DNA w czterech grupach seminologicznych

| Grupa seminologiczna | Zawartość DNA | | | |
|---|---|---|---|---|
| | I normalna $x = \bar{x} \pm 2s$ | II diagnost. wątpliwa $\bar{x} + 3s > x > \bar{x} + 2s$ | III poniżej normy $x < \bar{x} - 3s$ | IV powyżej normy $x > \bar{x} + 3s$ |
| | % przebadanych przypadków | | | |
| *Asthenospermia* | 52,0% | 2,4% | 0 | 45,2% |
| ***Asthenoteratospermia*** | 33,3% | 13,2% | 3,3% | 50,0% |
| *Oligoasthenospermia* | 25,0% | 0 | 8,3% | 66,6% |
| ***Oligoasthenoteratospermia*** | 34,4% | 6,8% | 3,4% | 55,1% |

znaleziono żadnego przypadku o zawartości DNA poniżej zawartości prawidłowej (p. tab. II).

Dla wykazania zależności między częstością występowania przypadków o prawidłowej zawartości DNA a liczbą produkowanych plemników, porównano dwie grupy seminologiczne, w których zachodzi produkcja prawidłowej liczby plemników z grupami typu oligo-, tj. ze zmniejszoną produkcją plemników. Zależność tę ukazuje rycina 1.




Ryc. 1. Wykazanie zależności między liczbą produkowanych plemników a odsetkiem przypadków patologicznych pod względem zawartości DNA. A+AT — liczba plemników w normie, OA+OAT — liczba plemników poniżej normy.

Zakres diagnostyczny

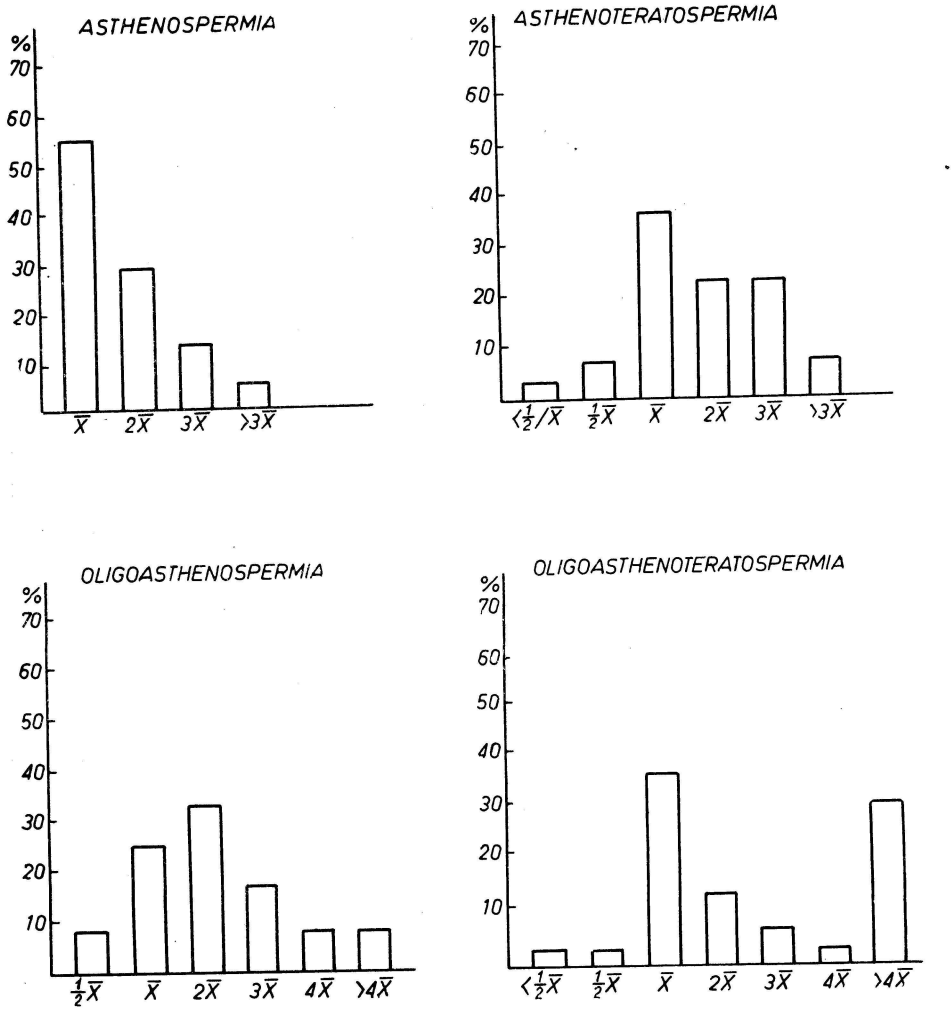
I — $x = \bar{x} \pm 2s$
II — $\bar{x} + 3s > x > \bar{x} + 2s$
III — $x < \bar{x} - 3s$
IV — $x > \bar{x} + 3s$

A — asthenospermia
AT — asthenoteratospermia
OA — oligoasthenospermia
OAT — oligoasthenoteratospermia

Na podstawie uzyskanych wyników należy stwierdzić, że w dwóch grupach seminologicznych charakteryzujących się prawidłową liczbą plemników (A + AT) poziom DNA w granicach normy fizjologicznej występuje znacznie częściej, aniżeli w grupach typu oligo (OA i OAT). Podwyższony poziom DNA ($x > \bar{x} + 3$ s) występuje w tej grupie w mniejszym odsetku przypadków w porównaniu z grupą oligoastheno- i oligoasthenoteratospermii (ryc. 1-IV).

Ponieważ w zestawieniu wyników zaobserwowano, że znalezione wartości poziomu DNA plemników stanowią często różne wielokrotności przy-

jętego zakresu normy, przeprowadzono szczegółową analizę częstości występowania wartości prawidłowych DNA jak też i ich wielokrotności w obrębie czterech przebadanych grup. Wyniki tej analizy przedstawia rycina 2. Z zebranych danych wynika, że asthenospermia charakteryzuje się największą liczbą przypadków wykazujących prawidłową zawartość DNA. W grupie tej występuje najmniejsze rozproszenie wyników, a przypadki o zawartości DNA powyżej 3 $\bar{x}$ pojawiają się niezwykle rzadko w porównaniu z pozostałymi grupami seminologicznymi. Największe odchylenia od wartości prawidłowych stwierdzono w grupie oligoasthenoteratospermii.




Ryc. 2. Procentowy rozkład częstości występowania nasienia o zawartości DNA w normie oraz poszczególnych odchyleń od normy.

## WNIOSKI

1. Oznaczenia zawartości DNA plemników w 10 przypadkach normospermii wykazały, że prawidłowa zawartość tego związku w 1 milionie plemników wynosi $0{,}34 \times 10^{-2}$ mg ($\pm$ 0,10).

2. W czterech przebadanych grupach rozpoznań seminologicznych tj. asthenospermii, asthenoteratospermii, oligoasthenospermii, oligoasthenoteratospermii, zaobserwowano występowanie obok przypadków o zawartości prawidłowej DNA plemników, różną wielokrotność tej wartości, a także przypadki, w których plemniki wykazywały poziom DNA niższy od normy fizjologicznej.

3. Największą liczbę przypadków o prawidłowej zawartości DNA plemników charakteryzowała się grupa asthenospermii, najmniejszą natomiast oligoasthenospermii. Nawiększe rozproszenie wyników oznaczeń DNA występowało w grupie oligoasthenoteratospermii.

Ю. Хмель. Т. Руцки, К. Сохацка, Г. Хадух

## ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ДНК) В ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ СПЕРМАТОЗОИДАХ

Содержание

Определялось содержание ДНК в нормальных сперматозоидах из проб спермы предназначенных для нормоспермии. Затем исследовалось содержание ДНК в пробах спермы четырёх семинологических групп со сниженной способностью оплодотворения: астеноспермией, астенотератоспермией, олигоастеноспермией и олигоастенотератоспермией.

На основании полученных результатов была установлена связь между содержанием ДНК в сперматозоидах и биологической ценностью спермы.

J. Chmiel, T. Rucki, K. Sochacka, G. Haduch

## STUDIES ON THE DEOXYRIBONUCLEIC ACID (DNA) CONTENT OF HUMAN SPERMATOZOA

Summary

The DNA content of normal spermatozoa from semen samples qualified as normospermia was determined. Then the DNA content was determined in semen samples of four seminological groups with reduced fertilization ability: asthenospermia, asthenoteratospermia, oligoasthenospermia and oligoasthenoteratospermia.

On the basis of the obtained results a connection is postulated between the DNA content of spermatozoa and the biological value of the semen.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Ford E. H.*: Human chromosomes, London, Academic Press, 1973. — 2. *Grajnert K.*: Metody statystyczne w badaniach kliniczno-laboratoryjnych, PZWL Warszawa 1970. — 3. *Joel C. A.*: Fertility Disturbances in Men and Women, S. Kargel, Bazylea, 1971. — 4. *Leidl W., Stolla R., Botzenhardt A.*: Proceedings of the VII World Congress, October, 1971, Tokyo and Kyoto, Japan. — 5. *Mancini R. E.*: Fertil. Steril., 1971, 22, 475. — 6. *Mann T.*: Biochemia nasienia, PWRiL, Warszawa, 1958. — 7. *Ringertz N. R.*: Exp. Cell Res., 1973, 76, 223. — 8. *Tamura S.*: Proceedings of the VII World Congress, October, 1971, Tokyo and Kyoto, Japan. — 9. *Steinberger E.*: JAMA 1973, 1973, 226, 1578. — 10. *Steward T. A., Forrester T.*: Proceedings of the University OTAGO Medical School, 1973, 3, 51.

11. *Young W. J.*: Cytogenetyka, PWN Warszawa 1970.

Wpłynęło dnia 18. VIII. 1976

Adres autorów: Prof dr med. J. Chmiel, Zakład Biochemii Instytutu Chemii i Analityki AM, 60-780 Poznań, ul. Grunwaldzka 6.