

УДК 575

Ю.В. Гонтарь, О.В. Чапля, И.Е. Ильин

КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА СПЕРМАТОЗОИДОВ ПАЦИЕНТОВ, ВСТУПАЮЩИХ В ПРОГРАММУ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Ю.В. Гонтарь, О.В. Чапля, И.Е. Ильин

ООО «Институт генетики репродукции», лабораторный отдел, цитогенетический подотдел (зав. – к.мед.н И.Е. Ильин), г.Киев; Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, биологический факультет, кафедра цитологии и генетики (зав. – к.б.н. А.М. Федота), г.Харьков.

CONDITION OF SPERM GENETIC COMPONENTS OF PATIENTS UNDERGOING ASSISTED REPRODUKTIVE TECHNOLOGIES PROGRAMS

Yu.V. Gontar, O.V. Chaplia, I.E. Ilin

SUMMARY

This survey indicates the necessity of complex approach to the determination of qualitative ejaculate characteristics for patients undergoing infertility treatment with ART programs.

КОМПЛЕКСНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО АПАРАТУ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПАЦІЄНТІВ, ЩО ВСТУПАЮТЬ ДО ПРОГРАМИ ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Ю.В. Гонтар, О.В. Чапля, І.Є. Ільїн

РЕЗЮМЕ

Дане дослідження вказує на необхідність комплексного підходу до визначення якісних показників еякуляту пацієнтів при лікуванні безпліддя за допомогою програм ДРТ.

Ключевые слова: эякулят, фрагментация ДНК сперматозоидов, FISH диагностика сперматозоидов.

Благодаря развитию вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и диагностических методик все чаще уделяется внимание мужскому фактору в бесплодных парах. В последние годы лечение мужского бесплодия характеризуется значительным прогрессом, связанным, главным образом, с внедрением в широкую медицинскую практику метода интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ). Этот передовой подход позволяет иметь потомство мужчинам с тяжелыми формами олиго-, астено-, терато- и даже азооспермии, ранее обреченных на абсолютное бесплодие. Оценка состояния сперматогенеза имеет важное диагностическое значение при различных формах нарушения репродуктивной функции. С этой целью разработан ряд методов, основанных на исследовании морфологии и состава по стадиям развития половых клеток. Традиционный спермиологический анализ является начальным звеном в цепи лабораторных исследований и позволяет судить о количестве сперматозоидов, их подвижности, жизнеспособности и морфологии. Однако данный метод не дает полной картины состояния каждой из стадий гаметогенеза. [8]. В большинстве клиник репродуктивной медицины Украины используются вышеуказанные классические тесты для изучения характеристик эякулята, которые не всегда отображают реальную информацию о его качестве.

При включении пациентов в программы ВРТ не стоит забывать, что возникновение патологических состояний репродуктивной системы часто обусловлено хромосомными, нестабильностью генетического аппарата, и наличием наследственной предрасположенности к заболеванию. Генетические отклонения у родителей, приводящие к нарушению репродукции и невозможности зачатия ребенка естественным путем, при применении программ ВРТ могут передаваться будущему потомству [2].

Наряду со стандартной спермограммой появились такие анализы, как фрагментация ДНК сперматозоидов, определение количества анеуплоидий в сперматозоидах методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), оценка зрелости сперматозоидов во всем объеме эякулята.

Метод определения зрелых сперматозоидов основан на избирательности красителя «метилловый синий» к гистонам и нечувствительности к протаминам, которые присутствуют только в зрелом сперматозоиде. [10].

Высокие уровни фрагментации ДНК сперматозоидов (30% и больше) могут приводить к нарушению оплодотворения [7], быть причиной низкого качества эмбрионов [9] и обуславливать неудачные повторные попытки ВРТ даже с использованием преимплантационной диагностики (ПГД) [6].

Результаты молекулярно-цитогенетического анализа половых клеток у пациентов с нормальным

и аномальным кариотипом и нарушением сперматогенеза позволяют установить определенную долю хромосомных анеуплоидий сперматозоидов. Некоторые из таких сперматозоидов могут являться причиной формирования эмбриона с численным нарушением кариотипа [1]. В связи с этим появилась необходимость разработки схемы исследования сперматозоидов для получения не только количественных, но и качественных показателей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор первичной информации проводился на базе цитогенетической лаборатории клиники «Институт генетики репродукции» (директор - к.мед.н. И.Е. Ильин) в период с 2011 по февраль 2012 гг. Обработаны данные о 57 мужчинах, которым назначалось комплексное исследование эякулята. После сдачи пациентом эякулята проводилась его количественная оценка, подсчитывалась общая концентрация, число подвижных сперматозоидов.

Количество незрелых сперматозоидов определялось с помощью анилинового теста, подсчитывалось 200 сперматозоидов. [5]. Уровень фрагментации ДНК сперматозоидов проводился методом SCD (Sperm Chromatin Dispersion test). Проводился подсчет 500 клеток, при котором оценивался размер ореола вокруг головы сперматозоида. Нефрагментированная ДНК

отображалась в виде большого ореола, тогда как сперматозоиды с фрагментированной ДНК имели небольшой ореол или же полное его отсутствие [4]. Также пациентам с нарушением сперматогенеза проводилось молекулярно-цитогенетическое исследование методом *FISH* на сперматозоидах с предварительной их деконденсацией. С целью определения уровня анеуплоидий сперматозоидов использовали многоцветную пробу AneuVysion для хромосом X, Y, 18, 13, 21 (Abbott-Vysis, USA). Микроскопический анализ осуществлялся с использованием флуоресцентного микроскопа с помощью программы ISIS. Для исследования уровня анеуплоидий в сперматозоидах проводился анализ 1000 клеток. [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование строилось на данных 57 пациентов, которым проводилось комплексное исследование эякулята. Среди обследуемой группы у 28% пациентов уровень фрагментации ДНК превышал норму, которая составляет 30% от общего количества анализируемых сперматозоидов. При этом самый низкий показатель (4,8%) и самый высокий уровень (58,8%) фрагментации был определен в возрастной группе от 31 до 35 лет, хотя среднее значение фрагментации было самым низким для указанной группы среди остальных исследуемых возрастов, что указано в таблице 1.

Таблица 1

Вариабельность показателя фрагментации ДНК сперматозоидов среди возрастных групп пациентов

Возрастная группа	Самый низкий показатель, %	Самый высокий показатель, %	Средний уровень фрагментации в группе, %
от 20 до 30 лет	11,5	43	22,1±0,94
от 31 до 35 лет	4,8	58,8	21,8±0,14
от 36 до 40 лет	5,8	48,2	23,4±1,17
от 41 и старше	8,0	58	24,2±1,4

Также было установлено, что у 83% пациентов с повышенной степенью фрагментации ДНК сперматозоидов определялось пониженное количество подвижных сперматозоидов, при чем показатель подвижности варьировал от 0,2% до 19%.

По данным молекулярно-цитогенетического анализа методом *FISH* уровень анеуплоидий в сперматозоидах был в диапазоне от 2,5% до 24,0%, тогда как в норме процент нерасхождений хромосом не должен превышать 2,5% [3]. При анализе сперматозоидов встречались такие варианты анеуплоидий как наличие двух половых хромосом (XX, YY, XY) или же нулисомия по половым хромосомам, наличие нескольких половых хромосом и аутосом (XXY 1818, XX 1818, XY 1818, XYY 1818), нулисомия по аутосомным хромосомам (X₁, Y₁, 13₁, 21₁), присутствие нескольких аутосом (1313 21, 132121, 1313 2121).

В среднем уровни нерасхождения по отдельным

исследованным хромосомам и общему количеству анеуплоидий статистически значимо отличались от нормы, что демонстрирует таблица 2.

Среди обследуемой группы у 46,4% пациентов уровень аномальной конденсации превышал норму, которая составляет 25% от общего количества анализируемых сперматозоидов. При этом самый низкий показатель (4,2%) был определен в группе возрастов от 36 до 30 лет, самый высокий уровень (49,0%) - в возрастной группе от 41 года и выше, хотя среднее значение аномальной зрелости было самым высоким для самой младшей группы (20-30 лет) среди остальных исследуемых возрастов, и составило 37,3%. Данные представлены в таблице 3.

ВЫВОДЫ

Генетическое обследование пациентов с нарушением репродуктивной функции приобретает определенное значение ввиду выявления у них высокой частоты генетических отклонений. С целью

Таблица 2

Вариабельность показателя анеуплоидий сперматозоидов и достоверность его отличия от нормы

Исследованные хромосомы	Вариабельность, %		Среднее значение нерасхождения, %	Норма, %	$\chi^2_{\text{факт}}$	$\chi^2_{\text{табл.}}$ p=0,001
	Самый низкий показатель	Самый высокий показатель				
X/Y	1,2	7,6	3,9±0,28	0,5	778,28	43,82
13	0,5	7,6	3,5±0,23	0,5	559,98	
18	0,4	8,2	3,6±0,20	0,5	550,38	
21	0	8,7	3,1±0,18	0,5	391,76	
Общее количество анеуплоидий (13,18, 21,X/Y)	2,5	24,0	14,2±0,62	2,5	93,28	

Таблица 3

Вариабельность показателя аномальной конденсации сперматозоидов среди возрастных групп пациентов

Возрастная группа	Самый низкий показатель, %	Самый высокий показатель, %	Средний уровень фрагментации в группе, %
от 20 до 30 лет	23,5	48,5	37,3±1,07
от 31 до 35 лет	6,0	38,0	22,6±1,05
от 36 до 40 лет	4,2	40,0	20,5±1,24
от 41 и старше	8,0	49,0	23,5±1,6

выявления данных аномалий рекомендуется проводить комплекс представленных обследований, которые являются необходимым этапом в подготовке к программе ВРТ, в чем клиника «Институт генетики репродукции» выступает новатором.

Все сказанное подводит к востребованности разработки и широкого внедрения в медицинскую практику профилактических мероприятий, в частности преимплантационной генетической диагностики, которая проводится в рамках программы экстракорпорального оплодотворения и дает возможность генетической селекции эмбрионов у пациентов с генетическими нарушениями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Г., Соловьев И.В., Демидова И.А. и др. Современные методы молекулярной цитогенетики в пре- и постнатальной диагностике хромосомной патологии // Клиническая лабораторная диагностика. - 2000. - № 8. - С. 36 - 39.
2. Глинкина Ж. И. Комплексное генетическое обследование мужчин: программа ИКСИ// Гинекология, том08/N, М. - 2006 - С.28-30.
3. Carrell D.T. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises // J Androl. - 2008. - Vol. 29(2). - P.124-33.
4. Chohan K.R., Griffin J.T., Lafromboise M. et al. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm // Journal of andrology. - 2006. - Vol.27(1). - P.246-261.
5. Hammadeh M.E. et al. The effect of chromatin condensation (Aniline Blue staining) and morphology

(strict criteria) of human permatzoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme // Human Reproduction - 1996 - vol 11(11) - P 2468-2471.

6. Henkel R., Hajimohammad M., Stalf T., Hoogendijk C. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy // Fertility Sterility. - 2004. - Vol. 81. - P. 965-972.

7. Muriel L., Garrido N., Fernandez J.L., Remohi J., Pellicer A. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection // Fertil Steril. - 2006. - Vol. 85. - P. 371-383.

8. Tesarik J., Mendoza C., Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. // Hum Reprod 2002. - Vol. 17. - P. 184-189.

9. Velez de la Calle J.F., Muller A., Walschaerts M., Clavere J.L., Jimenez C., Wittemer C. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion testing assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study // Fertil Steril. - 2008. - Vol. 90 - P. 1792-1799.

10. Xiaoyang Zhang et al. Sperm Nuclear Histone to Protamine Ratio in Fertile and Infertile Men: Evidence of Heterogeneous Subpopulations of Spermatozoa in the Ejaculate// Journal of Andrology - 2006 - Vol. 27(3) - P. 414-420.