

Цитогенетичні особливості сперматозоїдів у чоловіків з подружніх пар зі звичним невиношуванням вагітності

В.Г. Дубініна¹, О.М. Носенко¹, К.П. Головатюк²

¹Одеський національний медичний університет

²Медичний центр репродуктивного здоров'я «Гамета», м. Одеса

У статті розглянуті результати цитогенетичного вивчення рівня та характеру анеуплоїдій у чоловіків з подружніх пар зі звичним невиношуванням вагітності. Установлено, що для таких чоловіків характерна наявність у 48,75% випадків ознак патозооспермії; вірогідно більший відсоток числа анеуплоїдій сперматозоїдів в межах статевих хромосом в 6,57 разу, хромосоми 18 – в 13,00 і хромосом 13/21 – в 4,50; наявність анеуплоїдій навіть у 41,18% пацієнтів з нормальною в'язкістю сперми та рухливістю сперматозоїдів; більш високий відсоток сперматозоїдів з анеуплоїдіями статевих хромосом за наявності аномальної в'язкості/рухливості порівняно з чоловіками з нормальними показниками в'язкості/рухливості в 1,49 разу.

Ключові слова: звичне невиношування вагітності, чоловіки, сперматозоїди, флуоресцентна гібридизація *in situ*, хромосоми, анеуплоїдії.

Незважаючи на чисельні дослідження та досягнення в галузі репродуктивної медицини, які відбулися протягом останніх десятиліть, спонтанна втрата вагітності залишається найбільш частим її ускладненням [14]. Звичне невиношування вагітності, яке визначається як три або більше послідовних втрат вагітності, спостерігається приблизно в 1% всіх подружніх пар, що намагаються завагітніти. Хромосомні порушення плода лежать в основі, як мінімум, 60% всіх викиднів, що виникли в I триместрі вагітності [2]. Анеуплоїдія спостерігається в ембріональній тканині в 60% випадків у жінок, які перенесли від двох до дев'яти викиднів.

Чоловічий фактор має місце у понад 50% пар, які лікуються за допомогою допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) [7, 10]. Хромосомні дефекти сперматозоїдів є найбільш поширеними генетичними аномаліями у безплідних чоловіків і становлять 2,1–15,5% випадків [6]. Вони включають в себе неспецифічні розриви ДНК, чисельні порушення вмісту хромосом в сперматозоїдах, мікроделеції Y-хромосоми, зміни в епігенетичній регуляції батьківського геному. До невиношування вагітності можуть призвести робертсонівські мутації (злиття двох хромосом в області центромери, що змінює число хромосом або обмін плечей хромосом) [6]. Точні механізми, за допомогою яких ці фактори впливають на репродукцію, невідомі [12] та їхні наслідки для результатів ДРТ потребують проведення подальших досліджень [10].

Використання при ДРТ інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда (ІКСІ) збільшило ймовірність відбору аномального сперматозоїда для запліднення. Справді, анеуплоїдія сперматозоїдів пов'язана з батьківськими, отриманими *de novo* хромосомними аномаліями в ембріонах, плодах і новонароджених, зачатих після ІКСІ. Такі аномалії зустрічаються у 2–3% випадків при заплідненні методом ІКСІ, що в три рази більше, ніж у разі природного запліднення [4].

Порушення на різних рівнях батьківської геномної організації можуть впливати на результат ДРТ. Останні дані свідчать про те, що генетично загрозові сперматозоїди, що містять фрагментовану ДНК, хромосомні мікроделеції, ненормальне число хромосом або змінений генетичний відбиток, можуть бути пов'язаними з порушенням запліднення, ембріогенезу або розвитку плода, призвести до підвищеного ризику викидня та хромосомних аномалій у потомстві [3, 5, 10, 11, 13].

У безплідних чоловіків (близько 3%) порівняно з фертильними чоловіками реєструється триразове збільшення частоти анеуплоїдій сперматозоїдів.

У випадках звичного невиношування для оцінювання частоти хромосомних аномалій та визначення дефектів мейозу у вигляді анеуплоїдних спермій найчастіше використовують метод флуоресцентної гібридизації *in situ* – FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) сперматозоїдів. Хромосоми, які, як правило, аналізуються при FISH (13, 18, 21, X і Y), пов'язані з анеуплоїдіями, які сумісні з життям [7, 9, 11].

Мета дослідження: цитогенетичне вивчення рівня та характеру анеуплоїдій у чоловіків з подружніх пар зі звичним невиношуванням вагітності.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Під спостереженням знаходилися 240 чоловіків з подружніх пар зі звичним невиношуванням вагітності (група Н), які проходили лікування в Медичному центрі репродуктивного здоров'я «Гамета» м. Одеси і в циклах ДРТ методом ІКСІ в Університетській клініці «Центр відновної та реконструктивної медицини» Одеського національного медичного університету, і 30 умовно здорових фертильних чоловіків контрольної групи К. Діагноз звичного невиношування вагітності встановлювали на підставі наявності у жінок з обстежених подружніх пар мимовільних абортів в природних циклах і/або циклах ІКСІ. Біохімічні вагітності не враховувалися.

Усім пацієнтам відповідно до Наказу МОЗ України від 09.09.2013 № 787 про порядок застосування ДРТ в Україні проводили збір анамнезу, аналіз секрету передміхурової залози, дослідження на урогенітальні інфекції, визначення рівня гормонів, ультразвукове дослідження зовнішніх статевих органів і передміхурової залози, мікроскопічне дослідження еякуляту. Пацієнтам досліджуваних груп також проводили FISH-дослідження сперматозоїдів з метою об'єктивно виявити індивідуальні хромосоми та їхні окремі ділянки на метафазних пластинках (хромосоми в стані максимальної конденсації і візуалізації) або інтерфазних ядрах (деконденсовані хромосоми без чіткої морфологічної структури) на основі особливостей їхньої молекулярно-генетичної будови. Виявляли аномалії в статевих хромосомах (X, Y) та автосомах (13, 18, 21).

Багатобарвний FISH проводили за В. McInnes та співавторами (1998) [8] відразу після здачі пацієнтом еякуляту. Необхідний його об'єм тричі відмивали фосфатним буфером, наносили на стекла, сушили 1 год за температури +50 °С, фіксували і залишали на 18 год за температури -20 °С. Далі проводили деконденсацію шляхом інкубації в 0,1N розчині натрію гідроксиду, ополіскування стекла у фосфатному буфері, просушування на повітрі, передгібридаційну підготовку препарату та нанесення зондів. Щоб визначити частоту дисомії для автосом, був проведений двоколірний FISH, в якому зонди для хромосом 13 і 21 гібридували одночасно. Для цього використовували комерційну суміш – подвійний зонд, що містить зонд, мічений SpectrumGreen™ для хромосоми 13, і SpectrumOrange™, мічений для хромосоми 21 (Vysis, Downers Grove, IL, США). При триколірному FISH з метою визначення частоти дисомій для статевих хромосом, хромосоми 18 або їхніх диплоїдів використовували три прями мічені зонди: CEP 18 SpectrumAqua™, CEP X SpectrumGreen™, CEP Y SpectrumOrange™. Кожен сперматозоїд був ідентифікований наступним чином; як нормальний (18, X або 18, Y), дисомія за статевими хромосомами (18, X, Y, 18, X, X і Y, 18, Y), дисомія за хромосомою 18 (18,18, X і 18,18, Y), або диплоїдний (18,18, X, Y, або 18,18, X, X 18,18, Y, Y).

Скло з нанесеними зондами запечатували гумовим клеєм, поміщали в гібридизатор з встановленою програмою денатурації та гібридації за температури +37°C з тривалістю від 4 до 12 год. Потім для видалення негібридованих проб, а також з метою зменшення крос-гібридації альфоїдних послідовностей з центромерними ділянками інших хромосом, стекла піддавали відмиванню. Кожен слайд промивали окремо за температури 45°C в 50% формаміді/2 × SSC протягом 2 хв, 2 × SSC/0,1% Tween 20 протягом 10 хв, і 2 × SSC протягом 5 хв. Потім стекла встановлювали з 10 мкл 4', 6-діаміно-2-фенілндол (DAPI; Vysis) контрасту в антицивільно розчині.

Препарати фарбували та проводили детекцію флуоресцентних сигналів згідно зі стандартним протоколом.

Були оцінені тільки слайди, котрі показували ефективність гібридації понад 95%. Ядра сперматозоїдів рахували, коли останні були морфологічно збережені, не злипалися, не перекривалися, мали добре виражений контур хвоста і головки, деконденсованих не більше ніж у два рази від розміру нормальних недеконденсованих. Наявність хвоста вважали суттєвим фактором для достовірної оцінки.

FISH-препарати були досліджені за допомогою флуоресцентного мікроскопу Olympus BX60 при збільшенні × 1000. Використовували Vysis™ Аква/зелений/жовтогарячий потрійний смуговий набір фільтрів і Vysis™ DAPI/зелений/жовтогарячий потрійний смуговий фільтр-комплект. Розглядали мінімум 5000 ядер сперматозоїдів для вивчення хромосом і 10 000 ядер сперматозоїдів для дослідження пацієнта.

Отримані дані обробляли за допомогою IBM PC з використанням електронної таблиці «Excel».

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Середній вік обстежених пацієнтів склав в групі Н 32,40±1,07 року, у групі К – 32,10±1,00 (p>0,05).

Спостерігалися вірогідні розбіжності між середніми показниками спермограм чоловіків досліджуваних груп: об'єм еякуляту пацієнтів групи Н був менший за такий в групі К в 1,11 разу (3,28±0,06 проти 3,65±0,13 мл, p<0,02); в'язкість сперми більша в 1,33 (0,36±0,03 проти 0,27±0,02 мм, p<0,04); кількість сперматозоїдів в 1 мл мен-

ша в 1,36 (69,76±2,13 проти 94,93±16,50 млн, p<0,01); число активно рухливих сперматозоїдів нижче в 1,42 (22,58±0,65 проти 32,13±0,65%, p<0,01); відсоток патологічних форм сперматозоїдів більший в 2,63 (19,41±1,29 проти 7,37±1,75%, p<0,01); відсоток пацієнтів з аглютинацією сперматозоїдів більше в 4,46 (44,58% проти 10,00%, p<0,01); число лейкоцитів в полі зору більше в 2,74 разу (7,41±0,86 проти 2,70±1,62, p<0,01).

У обстежених чоловіків з подружніх пар зі звичним невиношуванням вагітності у 119/240 (49,58%) випадках спостерігалася нормозооспермія, у 121/240 (50,42%) – патозооспермія, у 117/240 (48,75%) – астенозооспермія, у 32/240 (13,33%) – олігозооспермія, у 62/240 (25,83%) – піозооспермія, 65/240 (27,08%) – тератозооспермія.

Пацієнти групи Н порівняно з чоловіками групи К мали вірогідно більший відсоток анеуплоїдів сперматозоїдів в межах статевих хромосом і хромосом 18 і 13/21 (1,38±0,08% проти 0,19±0,05%; 0,26±0,06% проти 0,02±0,00%; 0,27±0,02% проти 0,06±0,00%).

Слід зазначити, що у 49/119 (41,18%) пацієнтів з нормальною в'язкістю сперми і рухливістю сперматозоїдів реєстрували підвищену кількість анеуплоїдів у всіх проаналізованих хромосомах.

Чоловіки з аномальною в'язкістю сперми та рухливістю сперматозоїдів мали більш високий відсоток сперматозоїдів з анеуплоїдіями статевих хромосом, ніж чоловіки з нормальною в'язкістю/рухливістю (74/121 проти 49/119, тобто 61,16% проти 41,18%; ВПШ=2,25±0,26; ДІ:1,34–3,77).

Не виявлено кореляційної залежності між фрагментацією ДНК і рівнем анеуплоїдів сперматозоїдів.

ВИСНОВКИ

Для чоловіків з подружніх пар зі звичним невиношуванням вагітності характерними є:

- наявність у 48,75% випадків ознак патозооспермії;
- вірогідно більший відсоток числа анеуплоїдів сперматозоїдів в межах статевих хромосом в 6,57 разу, хромосоми 18 – в 13,00 і хромосом 13/21 – в 4,50 разу;
- наявність підвищеної кількості анеуплоїдів навіть у 41,18% пацієнтів з нормальною в'язкістю сперми та рухливістю сперматозоїдів;
- більш високий відсоток сперматозоїдів з анеуплоїдіями статевих хромосом за наявності аномальної в'язкості/рухливості порівняно з чоловіками з нормальними показниками в'язкості/рухливості в 1,49 разу.

Цитогенетические особенности сперматозоидов у мужчин из супружеских пар с привычным невынашиванием беременности

В.Г. Дубинина, Е.Н. Носенко, Е.П. Головатюк

В статье рассмотрены результаты цитогенетического изучения уровня и характера анеуплоидий у мужчин из супружеских пар с привычным невынашиванием беременности. Установлено, что для таких мужчин характерно наличие в 48,75% случаев признаков патозооспермии; достоверно больший процент числа анеуплоидий сперматозоидов в пределах половых хромосом в 6,57 раза, хромосомы 18 – в 13,00 и хромосом 13/21 – в 4,50; наличие повышенного числа анеуплоидий даже у 41,18% пациентов с нормальной вязкостью спермы и подвижностью сперматозоидов; более высокий процент сперматозоидов с анеуплоидиями половых хромосом при наличии аномальной вязкости/подвижности по сравнению с мужчинами с нормальными показателями вязкости/подвижности в 1,49 раза.

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности, мужчины, сперматозоиды, флуоресцентная гибридизация in situ, хромосомы, анеуплоидии.

Cytogenetic characteristics of men sperm from couples with recurrent miscarriage

V.G. Dubinina, O.M. Nosenko, K.P. Golovatyuk

The article describes the results of cytogenetic study of the aneuploidies level and nature in men from couples with recurrent miscarriage. It is shown that these men characterized by the presence of 48.75% of patozoospermia signs; significantly greater percentage of the number of sperm aneuploidies within the sex chromosomes in 6.57 times, 18

chromosomes – in 13,00 times and chromosomes 13/21 – in 4.50 times; even in the presence of increased number of aneuploidies in 41.18% patients with normal semen viscosity and sperm motility; a higher percentage of sperm aneuploidy sex chromosomes in the presence of abnormal viscosity/mobility than men with normal levels of viscosity/mobility in 1.49 times.

Key words: recurrent miscarriage, male, sperm, fluorescent hybridization in situ, chromosome, aneuploidy.

Сведения об авторах

Дубинина Владлена Геннадиевна – Кафедра онкологии с курсом лечевой диагностики, терапии и радиационной медицины Одесского национального медицинского университета, 65082, г. Одесса, пер. Валиховский, 2; тел.: (048) 723-84-41. E-mail: vladlena.od@gmail.com

Носенко Елена Николаевна – Кафедра акушерства и гинекологии № 1 Одесского национального медицинского университета, 65082, г. Одесса, пер. Валиховский, 2; тел.: (048) 723-84-41. E-mail: nosenko.olena@gmail.com

Головатюк Катерина Петрівна – Медицинский центр репродуктивного здоровья «Гамета», 65039, г. Одесса, ул. Слепнева, 3-А; тел.: (048) 738-68-69. E-mail: info@gameta.od.ua

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Carrell D.T. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises / D.T. Carrell // *J. Androl.* – 2008. – Vol. 29, № 2. – P. 124–133.
2. Chromosomal analysis of couples with Repeated Spontaneous Abortions in Northeastern Iran / [Ghazaey S, Keify F, Mirzaei F et al.] // *Int. J. Fertil.* – 2015. – Vol. 9, № 1. – P. 47–54.
3. Esteves S.C. A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility / S.C. Esteves // *J. Hum. Reprod. Sci.* – 2013. – Vol. 6, № 3. – P. 176–182. doi: 10.4103/0974-1208.121419.
4. FISH and tips: a large scale analysis of automated versus manual scoring for sperm aneuploidy detection / [Martinez G., Gillois P., Le Mitouard M. et al.] // *Basic. Androl.* – 2013. – Vol. 1, № 23. – P. 13. doi: 10.1186/2051-4190-23-13.
5. Fluorescence in situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss / [Ramasamy R., Scovell J.M., Kovac J.R. et al.] // *Fertil. Steril.* – 2015. – Vol. 103, № 4. – P. 906–909.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.029.
6. Genetic testing in male infertility / [Dada R., Thilagavathi J., Venkatesh S. et al.] // *Open Reprod. Sci. J.* – 2011. – Vol. 3. – P. 42–56.
7. Hwang K The use of fluorescent in situ hybridization in male infertility / Hwang K., Weedin J.W., Lamb D.J. // *Ther. Adv. Urol.* – 2010. – Vol. 2, № 4. – P. 157–169. doi: 10.1177/1756287210373758.
8. McInnes B. Donor age and the frequency of disomy for chromosomes 1, 13, 21 and structural abnormalities in human sperm using multicolour FISH / McInnes B., Rademaker A., Martin R. // *Hum. Reprod.* – 1998. – Vol. 13. – P. 2489–2494.
9. Ramasamy R. Fluorescent in situ hybridization of human sperm: diagnostics, indications, and therapeutic implications / Ramasamy R., Besada S., Lamb D.J. // *Fertil. Steril.* – 2014. – Vol. 102, № 6. – P. 1534–1539. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.013.
10. Seli E. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART / Seli E., Sakkas D. // *Hum. Reprod. Update.* – 2005. – Vol. 11, № 4. – P. 337–349. doi: 10.1093/humupd/dmi011.
11. Sperm aneuploidy and recurrent pregnancy loss / [Bernardini L.M., Costa M., Bottazzi C. et al.] // *Reprod. Biomed Online.* – 2004. – Vol. 9, № 3. – P. 312–320.
12. TEM and FISH studies in sperm from men of couples with recurrent pregnancy loss. / [Collodel G., Giannerini V., Antonio Pascarelli N. et al.] // *Andrologia.* – 2009. – Vol. 41, № 6. – P. 352–360. doi: 10.1111/j.1439-0272.2009.00936.x.
13. Tempest H.G. Cytogenetic risks in chromosomally normal infertile men / Tempest H.G., Martin R.H. // *Opin. Obstet. Gynecol.* – 2009. – Vol. 21, № 3. – P. 223–227.
14. Wettasinghe T.K. Y chromosome microdeletions are not associated with spontaneous recurrent pregnancy loss in a Sinhalese population in Sri Lanka / Wettasinghe T.K., Jayasekara R.W., Dissanayake V.H. // *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 25, № 12. – P. 3152–3156. doi: 10.1093/humrep/deq271.

Статья поступила в редакцию 03.07.2015