

А.М. ФЕСЬКОВ, Е.С. ЖИЛКОВА,  
И.М. БЕЗПЕЧНАЯ, Е.В. СОМОВА, В.А. ФЕСЬКОВ  
Центр репродукции человека «Клиника профессора Феськова А.М.»,  
Харьков  
E-mail: zhilkova@feskov.com.ua

## СВЯЗЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ С НАЛИЧИЕМ АНЕУПЛОИДИЙ В ИХ ЯДРАХ У МУЖЧИН С АСТЕНО-, ОЛИГО- И ТЕРАТОЗООСПЕРМИЕЙ



*Проведен анализ численных аномалий для хромосом 13, 18, 21, X, Y методом FISH в ядрах сперматозоидов для пациентов с астено-, олиго- и тератозооспермией в ходе обследования перед программой экстракорпорального оплодотворения. Процент анеуплоидных сперматозоидов был значительно выше у пациентов с олигозооспермией ( $p < 0,05$ ), чем у пациентов с астено- и тератозооспермией. Выявлено значительное отличие в процентном содержании сперматозоидов, несущих цитоплазматическую каплю, у пациентов с содержанием анеуплоидий спермы более 1,0 % и менее 0,2 %.*

© А.М. ФЕСЬКОВ, Е.С. ЖИЛКОВА, И.М. БЕЗПЕЧНАЯ,  
Е.В. СОМОВА, В.А. ФЕСЬКОВ, 2013

**Введение.** При проведении лечения с помощью вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) необходимо учитывать тот факт, что генетика эмбриона зависит как от качества ооцита, так и от качества сперматозоида [1]. Отклонения спермограммы пациента от нормы (астено-, олиго- либо тератозооспермия) могут свидетельствовать о наличии численных или структурных хромосомных патологий в ядрах сперматозоидов. Следует отметить, что морфологический анализ сперматозоидов не дает информации о наличии хромосомных или генных отклонений в ядрах сперматозоидов. Развитие и применение метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) позволило исследовать наличие хромосомных анеуплоидий в ядрах сперматозоидов человека. Использование нескольких ДНК-зондов дает возможность выявить наличие анеуплоидий сразу по нескольким хромосомам в одном ядре одновременно. Исследование ядер сперматозоидов пациентов с астено-, олиго- или тератозооспермией при лечении бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) является необходимым этапом обследования для выбора дальнейшей тактики лечения с целью назначения в случае необходимости преимплантационной диагностики (ПГД) перед переносом эмбрионов [2].

Цель настоящей работы – исследование наличия анеуплоидий хромосом 13, 18, 21, X, Y в ядрах сперматозоидов с помощью метода FISH для пациентов с двумя безуспешными попытками ЭКО и более. Исследована связь между морфологической структурой сперматозоидов и наличием хромосомных аномалий в их ядрах у пациентов с астено-, олиго- и тератозооспермией [3].

**Материалы и методы.** В ходе обследования перед программой ЭКО проводили анализ, который позволял выявлять численные аномалии половых хромосом и аутосом 13, 18, 21 в ядрах сперматозоидов методом FISH для 150 пациентов, из них 28 пациентов с олигозооспермией (концентрация сперматозоидов менее  $15 \cdot 10^6$  в 1 мл), 52 пациента с астенозооспермией (снижение подвижности сперматозоидов – менее 40 % подвижных форм) и 30 пациентов с диагнозом тератозооспермия (нарушения морфологии сперматозоидов – менее 15 % морфологически

нормальных форм); группу контроля составили 50 пациентов с нормозооспермией [4]. Средний возраст пациентов –  $41 \pm 5,5$  лет. В случае олигозооспермии анализ проводили при концентрации сперматозоидов не менее 2 млн/мл.

С целью проведения протокола FISH сперматозоиды отмывали с помощью PBS (phosphate buffer saline) («Sigma») и фиксировали смесью 96%-ного этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Зафиксированный препарат в течение 12–14 ч выдерживали при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для дальнейшей подготовки препарата использовали 70, 90 и 96%-ный этанол. После высыхания на предметное стекло с препаратом для дальнейшей гибридизации добавляли ДНК-зонды CEP Y (DYZ3) Satellite DNA SpectrumOrange, CEP X (DXZ1) Alpha Satellite DNA SpectrumGreen, CEP 18 (D18Z1) Alpha Satellite DNA SpectrumAqua, LSI 21 (loci D21S259, D21S341, D21S342, region 21q22.13-q22.2) SpectrumOrange, LSI 13 SpectrumGreen («Vysis-Abbott», США). Для инициации гибридизации препарат с добавленными ДНК-зондами в течение 10 мин выдерживали при температуре  $75^{\circ}\text{C}$ . Последующая инкубация занимала 5 ч при температуре  $42^{\circ}\text{C}$  во влажной камере [5–7]. Анализ флуоресцентного сигнала проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse 80i. Результат задокументировали с использованием цитогенетической программы Lucia FISH (LIM, Чехия).

Морфологический анализ сперматозоидов осуществляли с помощью программы OSTAХ CytoScreen (MTG, Германия), позволяющей исследовать живые сперматозоиды (без приготовления окрашенных препаратов) при увеличении в 6300 раз и учитывать не только форму и размер головок, но и размеры акросомы, наличие больших и малых вакуолей, а также отдельные виды патологии шеи. Каждый образец оценивался по десятибалльной шкале (норма 7–10 баллов) [8]. Исследование морфологических особенностей сперматозоидов проводилось на микроскопе Nikon Eclipse TE 2000S.

**Результаты исследований.** Содержание анеуплоидий в ядрах сперматозоидов не превысило 0,2 % у 52 пациентов (47,23 % случа-

Таблица 1  
Содержание анеуплоидных сперматозоидов (%) для пациентов с олиго-, астено- и тератозооспермией

Заключение спермограммы	Результат исследования ядер сперматозоидов методом FISH	
	менее 0,2 % анеуплоидных ядер	более 1,0 % анеуплоидных ядер
Олигозооспермия	42,86	57,14
Астенозооспермия	51,92	48,08
Тератозооспермия	53,33	46,67

Таблица 2  
Результаты исследования методом FISH морфологии сперматозоидов у пациентов с содержанием анеуплоидий спермы более 1,0 % и менее 0,2 %

Вид нарушений морфологии сперматозоидов	Содержание морфологически аномальных сперматозоидов, %	
	более 1,0 % анеуплоидных ядер	менее 0,2 % анеуплоидных ядер
Патологии головки (общее)	46,0	41,0
Большая головка	5,8	4,4
Маленькая головка	23,9	19,4
Грушевидная головка	6,9	7,4
Сигарообразная головка	6,5	8,4
Двойная головка	2,3	3,1
Изгиб шейки	13,5	16,1
Наличие цитоплазматической капли	16,2	5,5
Утолщение шейки	11,6	12,1
Патология хвоста	11,7	9,6
Вакуоли	56,4	47,9

Содержание анеуплоидий по гоносомам и аутосомам в ядрах сперматозоидов

Анеуплоидии X, Y	10,3 %
Анеуплоидии 13, 18, 21, X, Y	15,5 %
Анеуплоидии X, Y, 18	20,1 %
Анеуплоидии X, Y, 21	12,1 %
Анеуплоидии X, Y, 13	5,2 %
Анеуплоидии 18	13,7 %
Анеуплоидии 21	6,9 %
Анеуплоидии 13	1,7 %
Анеуплоидии 18, 21	12,1 %
Анеуплоидии 13, 21	1,7 %

ев) при норме не более 0,25 % [4, 5]. Содержание анеуплоидий в ядрах сперматозоидов превысило 1,0 % у 58 пациентов (52,73 % исследуемых образцов). Повышенное содержание хромосомных аномалий диагностировали среди 16 пациентов с олигозооспермией (57,14 %), 25 пациентов с астенозооспермией (48,08 %) и 14 пациентов с тератозооспермией (46,67 %). Среди мужчин с нормозооспермией повышенное содержание анеуплоидных сперматозоидов выявили у 6 пациентов (12,0 %). Результаты исследования представлены в табл. 1. Фото отдельных патологий представлены на рис. 1 и 2 (см. вклейку в конце номера).

При исследовании морфологических особенностей сперматозоидов выявлено незначительное отличие в процентном содержании сперматозоидов с патологией головок у пациентов с содержанием анеуплоидий спермы более 1,0 % и менее 0,2 %. Результаты анализа морфологии сперматозоидов представлены в табл. 2.

**Обсуждение полученных данных.** В результате исследования установлено, что повышенное содержание анеуплоидных сперматозоидов значительно чаще ( $p < 0,05$ ) диагностируется у пациентов, чьи показатели спермограммы отклоняются от нормы. Не выявлено значительных отличий по содержанию хромосомных аномалий в ядрах сперматозоидов между пациентами с астено- и тератозооспермией. Однако количество анеуплоидных сперматозоидов значительно ( $p < 0,05$ ) выше у пациентов с олигозооспермией. Незначительное отличие в процентном содержании сперматозоидов с патологией головок установлено у пациентов с содержанием анеуплоидий спермы более 1,0 % и менее 0,2 %, что подтверждает результаты ранее проведенных исследований [9, 10]. В настоящей работе показано, что содержание сперматозоидов, несущих цитоплазматическую каплю, у пациентов с повышенным содержанием анеуплоидных сперматозоидов значительно ( $p < 0,01$ ) выше, чем у пациентов, содержание сперматозоидов с аномальным числом хромосом у которых не превысило 0,2 %, что может свидетельствовать о повышенном количестве незрелых спермиев у мужчин с

высоким содержанием анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте. Полученные данные статистически обработаны с помощью  $\phi$ -критерия Фишера [11].

**Выводы.** Подтверждена необходимость проведения анализа анеуплоидий в ядрах сперматозоидов у пациентов с астено-, олиго- и тератозооспермией. Учитывая результаты исследования, такой анализ необходимо рассматривать как обязательный тест при обследовании пациента с олигозооспермией перед программой ЭКО. Наличие 1,0 % и более аномальных сперматозоидов у пациента является показанием к проведению преимплантационной генетической диагностики перед переносом эмбрионов в рамках программы ЭКО.

*O.M. Feskov, I.S. Zhylkova,  
I.M. Bezpechna, O.V. Somova, V.O. Feskov*  
Centre of Reproductive Medicine  
«Clinic of Professor Feskov A.M.»  
E-mail: zhilkova@feskov.com.ua

#### CORRELATION OF THE SPERMATOZOA MORPHOLOGY WITH THE PRESENCE OF ANEUPLOIDIES IN ITS NUCLEI IN THE PATIENTS WITH ASTHENO-, OLIGO- AND TERATOZOOSPERMIA

Examination of the numerous anomalies of the chromosomes 13, 18, 21, X, Y was carried out using FISH method before the IVF attempt in the patients with astheno-, oligo- and teratozoospermia. The percentage of aneuploid spermatozoa was significantly higher ( $p < 0,05$ ) in patients with oligozoospermia comparing with the ones with astheno- and teratozoospermia. There is a significant difference in content of spermatozoa with cytoplasmic drop depending on the FISH result.

*O.M. Феськов, Е.С. Жилкова,  
И.М. Безпечна, О.В. Сомова, В.О. Феськов*

#### ЗВ'ЯЗОК МОРФОЛОГІЧНИХ АНОМАЛІЙ СПЕРМАТОЗОЇДІВ З НАЯВНІСТЮ АНЕУПЛОЇДІЙ У ЇХНІХ ЯДРАХ У ЧОЛОВІКІВ З АСТЕНО-, ОЛІГО- ТА ТЕРАТОЗООСПЕРМІЄЮ

Проведено аналіз чисельних аномалій для хромосом 13, 18, 21, X, Y методом FISH у ядрах сперматозоїдів для пацієнтів з астено-, оліго- та тератозооспермією у ході обстеження перед програмою екстракорпорального запліднення. Зміст анеуплоїдних сперматозоїдів був значно ( $p < 0,05$ )

вище у пацієнтів з олігозооспермією в порівнянні з пацієнтами із астено- та тератозооспермією. Виявлено достовірну різницю відсоткового вмісту сперматозоїдів, що несуть цитоплазматичну краплю, у пацієнтів, для яких кількість анеуплоїдних сперматозоїдів становила більше 1,0 % й менше 0,2 % відповідно.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айламазян Э.К. Материалы XXV научной сессии НИИ акушерства и гинекологии. — М., 1996—1997. — С. 17—19
2. Ворсанова С.Г., Берешева А.К., Казанцева Л.З., Демидова И.А., Шаронин В.О. Молекулярно-цитогенетическая диагностика хромосомных аномалий у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции // Пробл. репродукции. — 1998. — № 4. — С. 41—46
3. Кулаков В.И., Леонов Б.В. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия (теоретические и практические подходы): Руководство для врачей. — М.: Мед. информ. агентство, 2004. — 782 с.
4. Dohle G.R., Diemer T., Giwercm A., Jungwirth A., Kopa Z., Krausz C. Мужское бесплодие / Науч. ред. А.С. Акопян. — Европейская ассоциация урологов, 2010. — 67 с.
5. Sarah E.D., Sean P.F., Colin D.M. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using in-situ hybridization // Mol. Hum. Rep. — 1997. — 3, № 7. — P. 585—598.
6. Staessen C., Hortournaye H., Michiels A., Devroey P. et al. PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients // Hum. Rep. — 2003. — 9, № 4. — P. 319—330.
7. Chantot-Bastaraud S., Ravel C., Berthaut I., McElreavey K. et al. Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility // Mol. Hum. Rep. — 2007. — 13, № 1. — P. 55—59.
8. Cassuto G.N., Plouchart J.M., Balet R. et al. Interest of a new morphological classification of human spermatozoa for ICSI allowing to obtain a better blastocyst score // Hum. Rep. — 2007. — 22, Supl. 1. — P. i113.
9. Acar H., Kilinc M., Guven S., Yurdakul T., Celik R. Comparison of semen profile and frequency of chromosome aneuploidies in sperm nuclei of patients with varicocele before and after varicocelectomy // Andrologia. — 2009. — 41, № 3. — P. 157—162.
10. Леонтьева О.А., Воробьева О.А. Сравнительный анализ морфологии сперматозоидов человека: нативный эякулят прогрессивно подвижная фракция // Пробл. репродукции. — 1999. — № 3. — С. 29—36.
11. Гланц С. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1999. — 460 с.

Поступила 01.12.11