

Хромосомные aberrации в кариотипе и половых клетках мужчин с нарушением репродуктивной функции

О.Д. Никитин¹, Ю.В. Гонтарь², И.Е. Ильин²

¹Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев

²Институт генетики репродукции

Проанализированы результаты обследования 376 пациентов, которым проводили кариотипирование. Нарушение сперматогенеза выявлено у 121 пациента, что составляет 32,2%. В соответствии с цитогенетическим анализом аномалии кариотипа составили 13,8% случаев от общего количества обследуемых пациентов, то есть – у 52 мужчин были определены вышеуказанные изменения структуры хромосом.

Результаты проведенного обследования свидетельствуют о необходимости разработки и широкого внедрения в медицинскую практику профилактических мероприятий, в частности преимплантационной генетической диагностики, которая дает возможность генетической селекции эмбрионов у пациентов с генетическими нарушениями.

Ключевые слова: нарушение репродуктивной функции, хромосомные аномалии, преимплантационная генетическая диагностика.

В последние годы лечение мужского бесплодия характеризуется значительным прогрессом, связанным с внедрением в широкую медицинскую практику метода интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ), который позволяет иметь потомство мужчинам с тяжелыми формами олиго-, астено-, терато- и даже азооспермии, ранее обреченных на абсолютное бесплодие.

При включении пациентов в программы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) не следует забывать, что возникновение патологических состояний репродуктивной системы часто обусловлено хромосомными, генными мутациями и наличием наследственной предрасположенности к заболеванию. Генетические мутации родителей, приводящие к нарушению репродукции и невозможности зачатия ребенка естественным путем, при применении программ ВРТ могут передаваться будущему потомству. До сих пор в литературе имеются противоречивые данные о генетических нарушениях у детей, рожденных в программах ВРТ. Многие авторы утверждают, что частота пороков развития у детей, рожденных вследствие ВРТ, достоверно не отличается от общепопуляционной. В то же время другие авторы отмечают повышение уровня пороков развития в среднем в 2,5 раза у мальчиков, рожденных в программе ИКСИ, по сравнению с девочками. Некоторые исследователи считают, что в программе ИКСИ возникают хромосомные мутации *de novo* и встречаются они значительно чаще, чем в популяции. Таким образом, пациенты с тяжелыми формами бесплодия, нуждающиеся в лечении методами ВРТ, требуют к себе повышенной генетической настороженности, так как главная задача ВРТ – получение здорового потомства [4].

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, наличии незрелых половых клеток. Однако данный метод не дает полной картины состояния каждой из стадий гаметогенеза.

Анализ гистопрепаратов биоптата яичка позволяет более глубоко и полно оценить состояние сперматогенеза. Наряду с преимуществами метод не лишен недостатков, так как процедура биопсии может сопровождаться различными осложнениями (например, развитием аутоиммунных процессов), поэтому показания к биопсии весьма ограничены. Среди недостатков метода следует отметить возможность анализа только фрагмента одного яичка.

Как известно, нарушение функции системы репродукции может быть генетически обусловлено. За последние несколько лет были картированы гены, продукты которых регулируют развитие и функцию гонад. Описаны мутации в генах, приводящие к нарушению процесса гаметогенеза. Известно, что хромосомные аномалии (ХА) также ведут к нарушению репродуктивной функции. Среди хромосомопатий специалисты различают структурные и числовые ХА. В общей популяции уровень ХА невелик и составляет 0,5–3,0%, в то время как среди пациентов с нарушением фертильности доля лиц с ХА возрастает до 7–10%, а, например, среди мужчин с азооспермией достигает 20%. Эти данные свидетельствуют о необходимости цитогенетического исследования у пациентов с нарушением репродуктивной функции. Также необходимо исследовать хромосомный набор половых клеток (ПК) для исключения гонадного мозаицизма. В случае выявления последнего следует провести расчет риска рождения ребенка с наследственной патологией.

Цитогенетическое исследование незрелых гамет на разных стадиях их развития у мужчин проблематично вследствие относительной трудности получения материала. При биопсии яичка возможен анализ хромосом ПК, находящихся на определенных стадиях своего развития (сперматоциты на стадии пахитены, диакинеза-метафазы I, метафазы II), но биопсия яичка показана лишь для узкой группы пациентов с а- и олигозооспермией III степени. В 90-х годах XX века был разработан метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), при котором возможно анализировать ХА в ядрах не только клеток, находящихся на стадии метафазы, но и интерфазных соматических и ПК [6].

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH – fluorescence *in situ* hybridization) заключается в проведении про-

БЕСПЛОДИЕ И ПЛАНИРОВАНИЕ СЕМЬИ

Таблица 1

Количество обследованных больных и удельный вес пациентов с патоспермией

Пациенты	2009	2010	2011 (январь – март)	Всего
Общее количество пациентов, которым проводили кариотипирование	146	195	35	376
Количество пациентов с нарушением сперматогенеза	36	58	27	121
%	24.7	29.7	77.1	32.2

цедуры молекулярной гибридизации ДНК зонда с ДНК фиксированного на стекле материала (интерфазных ядер или метафазных хромосом) с последующим использованием флуоресцентной микроскопии для детекции результатов гибридизации. Для идентификации индивидуальных хромосом при проведении диагностики наиболее эффективны так называемые хромосомоспецифичные ДНК зонды, созданы на основе клонированных последовательностей сателлитной ДНК человека. Но хромосомы 4 и 9, 5 и 19, 13 и 21, 14 и 22 содержат практически идентичные и неотличимые при гибридизации *in situ* варианты альфоидной ДНК, и, следовательно, надежно идентифицировать эти хромосомы с помощью *FISH* на основе альфоидных ДНК зондов нельзя. Поэтому широкое применение находят также сайт-специфические (локус-специфические) ДНК зонды, которые маркируют индивидуальные хромосомные участки или индивидуальные гены [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор первичной информации проводили на базе цитогенетической лаборатории клиники «Институт генетики репродукции» (директор – канд. мед. наук И.Е. Ильин) в период с 2009 по 2011 г. Проанализированы результаты обследования 376 мужчин, которым проводили кариотипирование.

Для данного анализа использовали стандартную методику культивирования лимфоцитов периферической крови и приготвление препаратов метафазных хромосом и интерфазных клеток. Кровь для цитогенетического анализа получали путем пункции локтевой вены, после чего цельную кровь добавляли к питательной среде. Культивирование проводили при температуре +37 °С в течение 72 ч. Для накопления лимфоцитов в стадии метафазы вводили колхицин. По окончании культивирования клетки с питательной средой центрифугировали и полученный осадок подвергали гипотонической обработке 0,075М раствором калия хлорида до 20 мин при температуре +37 °С. Затем клетки фиксировали в трех сменах охлажденной +4 °С смеси этанол-уксусная кислота в соотношении 3:1, приготовленной *ex tempore* (перед использованием). После окончательного центрифугирования и удаления супернатанта, суспензию клеток раскапывали на охлажденные влажные стекла и высушивали на воздухе. Окрашивание препаратов проводили GTG-методом [2]. Для каждого пациента анализировали 15–30 метафазных пластинок с разрешением 550 сегментов на гаплоидный набор [5].

Пациентам с нарушением сперматогенеза проводили 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).

Подготовку препаратов производили непосредственно после сдачи пациентом эякулята. Необходимый объем спермы помещали в пробирку и трижды отмывали фо-

Таблица 2

Характеристика пациентов с нарушениями сперматогенеза

Нарушения сперматогенеза	2009	2010	2011	Всего
Азооспермия	33	52	27	112
Астенозооспермия	1	2	-	3
Олигоастенозооспермия	-	2	-	2
Олигозооспермия	-	1	-	1
Астенотератозооспермия	1	-	-	1
Криптозооспермия	1	-	-	1
Амиоастенотератозооспермия	-	1	-	1
Всего	121			

сфатным буфером, после чего раскапывали на стекла и сушили 1 ч при температуре +50 °С. Затем стекла опускали в емкость с фиксатором и оставляли на 18 ч при температуре -20 °С. По прошествии указанного времени проводили деконденсацию путем инкубации в 0,1N растворе натрия гидроксида, после чего стекла споласкивали в фосфатном буфере и просушивали на воздухе. Далее проводится предгибридизационная подготовка препарата и наносятся пробы CEP 18/X/Y и LSI 13/21 на предварительно отмеченные зоны гибридизации. Стекло с нанесенными зондами помещали в гибридизатор с установленной программой денатурации и гибридизации при +37 °С длительностью от 4 до 12 ч. Затем для удаления негибридизовавшихся проб, а также с целью уменьшения кросс-гибридизации альфоидных последовательностей с центромерными участками других хромосом, стекла подвергают отмывке. Далее препараты окрашивали и проводили детекцию флуоресцентных сигналов согласно стандартному протоколу. Микроскопический анализ осуществляли с использованием флуоресцентного микроскопа, оборудованного соответствующим набором фильтров и программой автоматической обработки изображения, в данном случае программа ISIS. Для исследования уровня анеуплоидий в сперматозоидах проводили анализ 1000 клеток [7, 8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проанализированы результаты обследования 376 пациентов, которым проводили кариотипирование. Нарушение сперматогенеза выявлено у 121 пациента, что составляет 32,2% от общего количества анализируемых случаев. (табл. 1).

В свою очередь, группа пациентов с нарушением сперматогенеза была представлена такими вариантами патоспермии, как азооспермия (112 пациентов), астенозооспермия (3 пациента), олигоастенозооспермия (2 пациента), олигозооспермия, астенотератозооспермия, криптозооспермия, амиоастенотератозооспермия (по 1 пациенту) (табл. 2).

БЕСПЛОДИЕ И ПЛАНИРОВАНИЕ СЕМЬИ

Таблица 3

Количественная характеристика аномалий кариотипа

Показатели	2009	2010	2011	Всего
Общее количество пациентов, которым проводили кариотипирование	146	195	35	376
Количество пациентов с аномалиями кариотипа	20	29	3	52
%	13,7	14,9	8,6	13,8
Транслокации	3	3	-	6
Синдром Кляйнфельтера	1	3	-	4
Инверсии	4	6	1	11
Увеличение гетерохроматинового района аутосом	2	5	1	7
Увеличение гетерохроматинового района хромосомы Y	-	3	-	3
Уменьшение гетерохроматинового района хромосомы Y	5	6	-	11
Увеличение спутников и спутничных нитей акроцентрических хромосом	7	8	2	17

Таблица 4

Удельный вес аномалий кариотипа среди пациентов с нарушением сперматогенеза

Показатель	2009	2010	2011	Всего
Количество пациентов с нарушением сперматогенеза	36	58	27	121
Количество пациентов с аномалиями кариотипа	5	12	3	20
%	13,9	20,7	11,1	16,5
Транслокации	2	-	-	2
Синдром Кляйнфельтера	1	3	-	4
Инверсии	-	3	-	3
Увеличение гетерохроматинового района аутосом	-	1	1	2
Увеличение гетерохроматинового района хромосомы Y	-	2	-	2
Уменьшение гетерохроматинового района хромосомы Y	2	2	-	4
Увеличение спутников и спутничных нитей акроцентрических хромосом	-	2	2	4

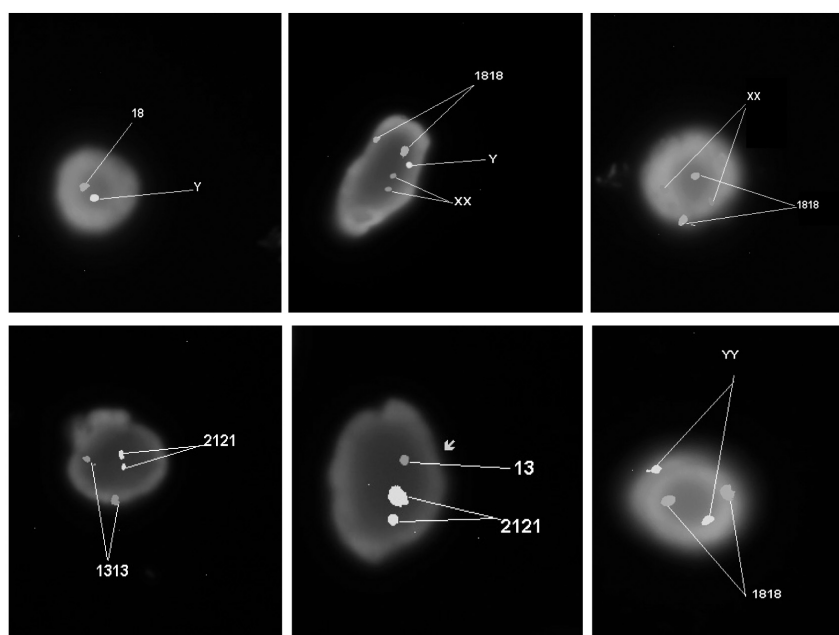


Рисунок. Варианты хромосомных анеуплоидий сперматозоидов

В соответствии с цитогенетическим анализом аномалии кариотипа составили 13,8% случаев от общего количества обследуемых пациентов, то есть у 52 мужчин были определены вышеуказанные изменения структуры хромосом. В табл. 3 представлены общие количественные характеристики аномалий кариотипа.

При рассмотрении кариотипов группы пациентов с нарушением сперматогенеза оказалось, что процент аномалии структуры хромосом выше и составляет 16,5%, что приведено в табл. 4.

По данным молекулярно-цитогенетического анализа методом *FISH* уровень анеуплоидий в сперматозоидах был в диапазоне от 2,5% до 15,4%, тогда как в норме процент нерасхождений хромосом не должен превышать 2,5% [7]. При анализе сперматозоидов встречались такие варианты анеуплоидий, как наличие двух половых хромосом (XX, YY, XY) или нулисомия по половым хромосомам, наличие нескольких половых хромосом и аутосом (XXY 1818, XX 1818, XY 1818, XYY 1818), нулисомия по аутосомным хромосомам (X₂, Y₂, 13₂, 21₂), присутствие нескольких аутосом (1313 21, 13 2121, 1313 2121). Некоторые вариации представлены на рисунке.

Таким образом, было установлено, что нерасхождение по половым хромосомам составило от 1,2% до 2,5%, по хромосоме 18 вариабельность показателя была от 0,4% до 2,1%. Уровень анеуплоидий хромосомы 13 был установлен в диапазоне от 0,5% до 3,5%, а по хромосоме 21 показатель нерасхождения находился в пределах от 0 до 8,7% при том, что уровень анеуплоидии в норме по одной хромосоме не должен быть выше 0,5% [3, 7].

ВЫВОДЫ

Генетическое обследование пациентов с нарушением репродуктивной функции имеет важное значение ввиду выявления у них высокой частоты генетических мутаций. Следует отметить, что эти обследования необходимо проводить мужчинам до включения их в программу ИКСИ.

Знания о частоте и характере генетических нарушений у пациентов с нарушением репродуктивной функции позволят улучшить лечебно-диагностическую и консультативно-диагностическую помощь супружеским парам с бесплодием, а также совершенствовать мероприятия, направленные на профилактику бесплодия.

Результаты проведенного обследования свидетельствуют о необходимости 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.

Хромосомні аберації в кариотипі та статевих клітинах чоловіків з порушенням репродуктивної функції

О.Д. Нікітін, Ю.В. Гонтар, І.Є. Ільїн

Проаналізовано результати обстеження 376 пацієнтів, яким проводили кариотипування. Порушення сперматогенезу виявлено у 121 пацієнта, що складає 32,2%. Відповідно до цитогенетичного аналізу аномалії кариотипу склали 13,8% випадків, тобто у 52 чоловіків були визначені наведені вище зміни структури хромосом. Результати проведеного обстеження свідчать про необхідність розроблення і широкого застосування в медичну практику профілактичних заходів, а саме – преимплантаційної генетичної діагностики, яка дає можливість генетичної селекції ембріонів у пацієнтів з генетичними порушеннями.

Ключові слова: порушення репродуктивної функції, хромосомні аномалії, преимплантаційна генетична діагностика.

Chromosomal aberrations in the karyotype and germ cells of men with reproductive dysfunction

O. Nikitin, J. Gontar, I. Ilyin

Analyzed the results of a survey 376 patients who underwent karyotyping. Disruption of spermatogenesis was detected in 121 patients, accounting for 32,2%. In accordance with the cytogenetic analysis of karyotype abnormalities were 13,8% of cases, the total number of patients under investigation 52 men have been identified above changes in the structure of chromosomes.

The results of the survey indicate the need for the development and widespread adoption in medical practice preventive measures, in particular, preimplantation genetic diagnosis, which enables genetic selection of embryos in patients with genetic disorders.

Key words: reproductive disorders, chromosomal abnormalities, preimplantation genetic diagnosis.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ворсанова С.В., 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. Ворсанова С.В., Юров Ю.Г., Чернышов В.Н. Хромосомные синдромы и аномалии. // Ростов-на Дону. – 1999. – С. 155–156.
3. Ворсанова С.В., Юров Ю.Г., Чернышов В.Н. Медицинская цитогенетика // М., 2006. – С. 219–222.
4. Глинкина Ж.Т. Комплексное генетическое обследование мужчин: программа ИКСИ // Гинекология, том 8. – М., 2006. – С. 28–30.
5. Зерова-Любимова Т.Е., Горювенко Н.Г. Стандарты анализа препаратов хромосом человека (методические рекомендации). – К., 2003. – С. 10.
6. Курило Л.Ф., Шаповал Н.В., Дубинская В.П. и др. Структура хромосомной патологии среди пациентов с нарушением репродуктивной системы. Тез. докл. 1 (3) Рос. съезда мед. генетиков. – М., 1994; 1: 85–86.
7. Курило Л.Ф., Шилейко Л.Ф., Мхитарова Е.В. и др. Структура наследственной патологии половой системы при обследовании пациентов с нарушением репродукции. Тезисы конференции «Наследственные заболевания», МГНЦ РАМН, М., XI 1997 Carrell D., J Andrology // 2008, 29:124–133.