

## АКУШЕРСТВО ТА ГІНЕКОЛОГІЯ

УДК 573.6:577.21-075

### ВПЛИВ ФРАГМЕНТАЦІЇ ДНК У СПЕРМАТОЗОЇДАХ НА РОЗВИТОК ЕМБРІОНІВ У ПРОГРАМАХ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ

Є. С. Жилкова<sup>1</sup>, О. О. Тищенко<sup>1</sup>, В. О. Феськов<sup>1</sup>, О. М. Феськов<sup>1</sup>, О. М. Федота<sup>2</sup>.

*1-Центр репродукції людини ТОВ «Сана-Мед»<sup>1</sup>*

*2-ХНУ імені В.Н. Каразіна<sup>2</sup>*

У роботі досліджено вплив рівня фрагментації ДНК у сперматозоїдах на розвиток ранніх ембріонів у програмах екстракорпорального запліднення для чоловіків зі зниженою фертильністю. Доведено зворотній зв'язок між рівнем фрагментації ДНК у сперматозоїдах та загальною частотою формування бластоцист і часткою бластоцист морфологічно високої якості у пацієнтів з порушеннями фертильності ( $r_s = -0,59$ ;  $r_s = -0,56$ ). Оцінка якості сперми чоловіків зі зниженою фертильністю є необхідним заходом перед використанням допоміжних репродуктивних технологій.

**Ключові слова:** чоловіча фертильність, фрагментація ДНК сперматозоїдів, допоміжна репродуктивна технологія, ембріогенез

#### Вступ.

В Україні 20% подружніх пар неплідні. Частка чоловічого непліддя у нашій країні складає практично 50%. У 15% випадків зниження репродуктивної функції у чоловіків пов'язано з такими генетичними факторами, як генні мутації, мікрделеції, особливості каріотипу [1, 2]. Генетичні порушення у сперматозоїдах, зокрема, фрагментація ДНК, можуть бути причиною зниження чоловічої фертильності [3, 4]. Важливим питанням є визначення здатності сперми низької якості до нормального запліднення ооцитів та подальшого розвитку ембріонів з високим імплантаційним потенціалом. Одним з головних критеріїв нормального розвитку ембріону є формування бластоцисти на п'ятий день розвитку [5].

**Метою даної роботи** є дослідження залежності процесу формування і якості бластоцист при отриманні ембріонів методами допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) від рівня фрагментації ДНК у сперматозоїдах у чоловіків зі зниженою фертильністю.

#### Матеріали та методи.

Дослідження впливу фрагментації ДНК на процеси раннього ембріогенезу проведено серед 30 чоловіків з порушеннями фертильності. Аналіз фрагментації ДНК у сперматозоїдах виконано за допомогою методу SCD (sperm chromatin dispersion) (HaloSperm, Halotech, Іспанія) [6]. Для контрольованої стимуляції овуляції (КСВ), з метою отримання ооцитів, застосовували протокол з агоністами гонадотропін-рилізінг-гормону (аГнРГ). Стимуляція овуляції займала не менш десяти днів. У день трансвагінальної пункції середній розмір фолікулів досягав 18 мм. Для підтримки лютеїнової фази були використані препарати прогестеронового ряду.

Отримані зиготи і ембріони культивувалися в середовищі Global Total (LifeGlobal Group, Бельгія) при температурі 36,8–37,1°C; при рівні CO<sub>2</sub> 6,0–6,2% [7]. Морфологію бластоцист оцінено за класифікацією Gardner D.K. [8]. Аналіз зв'язку між рівнем фрагментації ДНК у сперматозоїдах і частотою формування та морфологією бластоцист проведено за допомогою кореляційного аналізу за Спірменом [9].

#### Результати дослідження та їх обговорення.

Віковий інтервал у чоловіків з порушеннями фертильності в розглянутій групі склав від 26 до 46 років. Окремо було розглянуто підгрупу чоловіків у віці старше 35 років –  $40,3 \pm 3,2$  років ( $n = 15$ ), з огляду на результати, отримані нами у попередніх дослідженнях [10]. Доведено статистично значущий зворотній зв'язок між рівнем фрагментації ДНК у сперматозоїдах та частотою формування бластоцист (ЧФБ) у загальній групі пацієнтів ( $r_s = -0,59, p < 0,01$ ). Фото сперматозоїдів з нормальною та фрагментованою ДНК показано на рисунку 1. Продемонстровано негативний вплив фрагментації ДНК у чоловічих гаметах на частоту формування бластоцист високої морфологічної якості серед пацієнтів старше 35 років ( $r_s = -0,56, p < 0,05$ ).

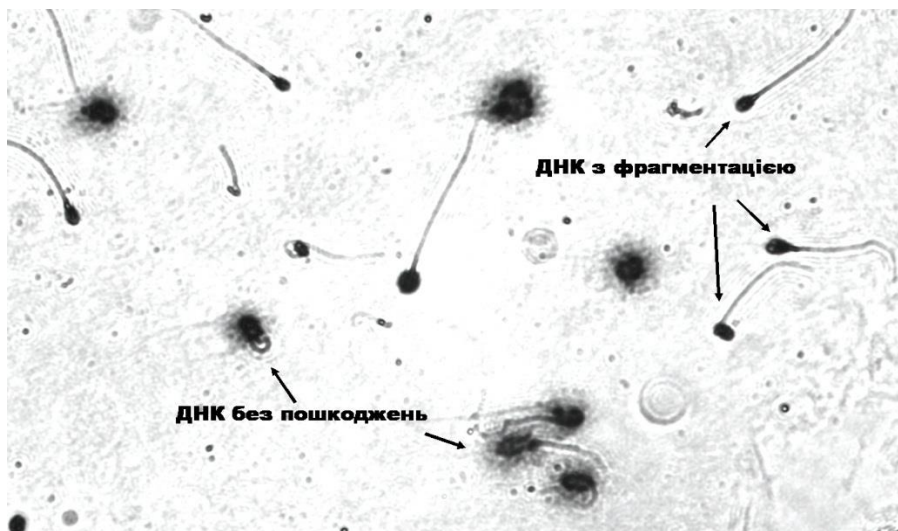


Рис. 1. Дослідження рівня фрагментації ДНК у сперматозоїдах методом SCD.

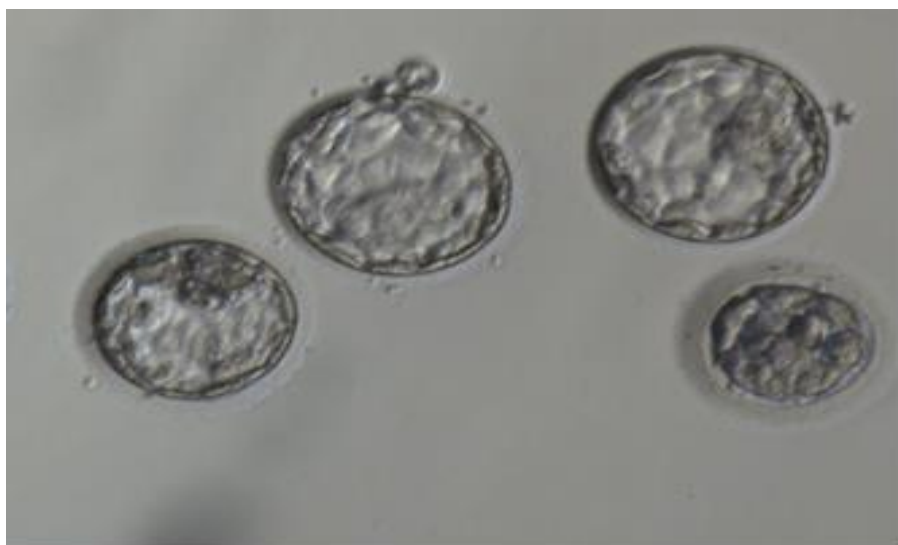
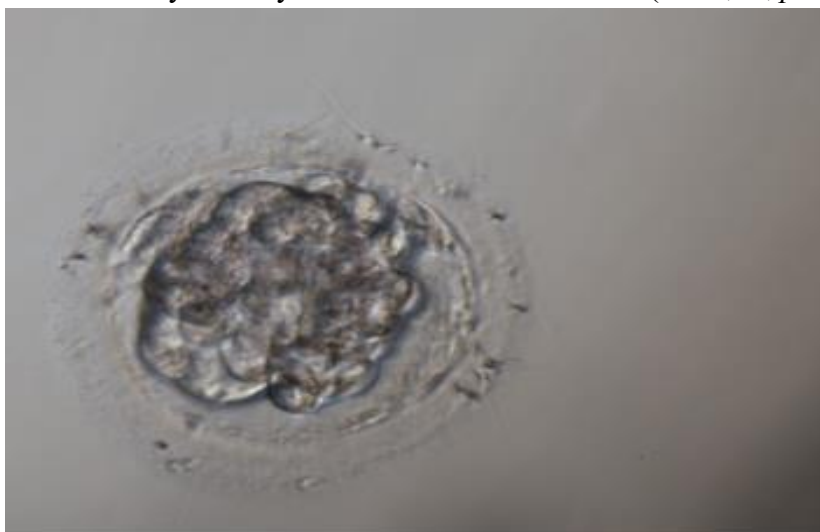


Рис. 2. Бластоцисти високої морфологічної якості.

Фото бластоцист різної морфологічної якості наведені на рисунках 2, 3.

Статистично значущої кореляції між ЧФБ при використанні допоміжних репродуктивних технологій та віком пацієнтів у даному дослідженні не виявлено ( $r_s = 0,12$ ,  $p > 0,05$ ).



**Рис. 3.** Бластициста низької морфологічної якості

### Висновки

Доведено зв'язок між показниками рівня фрагментації ДНК сперми і особливостями раннього розвитку ембріонів, отриманих у програмах екстракорпорального запліднення. Оцінка якості сперми чоловіків зі зниженою фертильністю є необхідним заходом перед використанням допоміжних репродуктивних технологій. За даними літератури, морфологія бластоцист не завжди залежить від хромосомних змін в ембріонах [11].

Отже, перспективним є проведення передімплантаційної генетичної діагностики ембріонів, отриманих у програмах екстракорпорального запліднення у пацієнтів з високим рівнем фрагментації ДНК у сперматозоїдах, для вивчення ефекту даного порушення на каріотип ембріонів.

### Література

1. Атраментова Л.О. Статистичні методи в біології: підруч. для студентів біолог. спец. вищих навч. Закладів / Л.О. Атраментова, О.М. Утевська. – Х.: [б. в.], 2007. – 286 с.
2. Исследование связи между нарушением компактизации хроматина и наличием анеуплоидий в ядрах сперматозоидов у мужчин со сниженной фертильностью. / А.М. Феськов, Е.С. Жилкова, Н.Н. Сотник Н.Н. [и др.] // Вестник ХНУ им. В.Н. Каразина. Серия: Биология. – 2013. – Вып. 17, № 1056. – С. 92–98.
3. Кулаков В.И. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия (теоретические и практические подходы): Руководство для врачей – 2-е изд., доп./ В. И. Кулаков, Б. В. Леонов. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 782 с.
4. Мужское бесплодие (научное редактирование: Акоюн А.С.) / Dohle G.R., Diemer T., Giwercm A., Jungwirth A., Kopa Z., Krausz C. – Европейская ассоциация урологов, 2010. – 67 с.
5. Dohle G.R. Association of Urology Working Group on Male Infertility / G.R. Dohle, T. Diemer, Z. Kopa. – Eur Urol, 2014. – Режим доступа: [http://uroweb.org/wp-content/uploads/17-Male Infertility\\_LR.pdf](http://uroweb.org/wp-content/uploads/17-Male Infertility_LR.pdf).
6. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation / B.E. Speyer, A.R. Pizzey, M. Ranieri [et al.] // Hum Reprod. – 2012. – V. 25, № 7. – P. 1609–1618.

7. Gardner D. K. Human Gametes and Preimplantation Embryos / D. K. Gardner, D. Sakkas, E. Seli, D. Wells. – New York : Springer Science & Business Media, 2013. – 306 p.
8. Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos. / L. Rodrigo, V. Peinado, E. Mateu [et al.] // Fertil. Steril. – 2010. – V. 94, № 4. – P. 1380–1386.
9. Mohamed E. Aneuploidy and Male Fertility / E. Mohamed, M. Pang // Aneuploidy: Etiology, Disorders and Risk Factors. – 2012. – Chapter IX. – P. 144–159.
10. Oleszczuk K. Intra-individual variation of the sperm chromatin structure assay DNA fragmentation index in men from infertile couples / K. Oleszczuk, A. Giwercman, M. Bungum // Hum Reprod. – 2011. – V. 26, № 12. – P. 3244–3248.
11. The graduated embryo score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage – stage embryos / J.D. Fisch, H. Rodriguez, R. Ross [et al.] // Hum Reprod. – 2001. – V. 16, № 9. – P. 1970–1975.

### **ВЛИЯНИЕ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК В СПЕРМАТОЗОИДАХ НА РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ В ПРОГРАММАХ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ**

**Е. С. Жилкова, А. А. Тищенко, В. А. Феськов, А. М. Феськов, А. М. Федота.**

Исследовано влияние уровня фрагментации ДНК в сперматозоидах на развитие ранних эмбрионов в программах экстракорпорального оплодотворения для мужчин со сниженной фертильностью. Доказана обратная связь между уровнем фрагментации ДНК в сперматозоидах и общей частотой формирования бластоцист и долей бластоцист морфологически высокого качества у пациентов с нарушениями фертильности ( $r_s = -0,59$ ;  $r_s = -0,56$ ). Оценка качества спермы мужчин с пониженной фертильностью является необходимой мерой перед использованием вспомогательных репродуктивных технологий.

**Ключевые слова:** мужская фертильность, фрагментация ДНК сперматозоидов, вспомогательная репродуктивная технология, эмбриогенез

### **INFLUENCE OF DNA FRAGMENTATION IN THE SPERM ON THE DEVELOPMENT OF EMBRYOS *IN VITRO* FERTILIZATION PROGRAM**

**Ye. S. Zhylkova, A. A. Tischenko, V. A. Feskov, A. M. Feskov, O. M. Fedota.**

The effect of the level of DNA fragmentation in the sperm on the development of early embryos in IVF programs for men with low fertility was investigated. A significant negative association between the level of DNA fragmentation in the sperm and the total blastocyst formation rates and a percent of blastocysts with high quality morphology in patients with impaired fertility is proved ( $r_s = -0,59$ ;  $r_s = -0,56$ ). Evaluation of semen quality in men with low fertility is a necessary step before the use of assisted reproductive technologies.

**Key words:** men fertility, DNA fragmentation in the sperm, assisted reproductive technologies, embryogenesis.