

21. Sarah E.D., Sean P.F., Colin D.M. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using in-situ hybridization // *Molecular Human Reproduction*. – 1997. – 3, N 7. – P. 585–598.
22. Staessen C., Hortournaye H., Michiels A., Devroey P., Lierbaers I. PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients // *Human Reproduction*. – 2003. – 9, N 4. – P. 319–330.
23. Speyer B.E., Pizzey A.R., Ranieri M., Joshi R., Delhanty J.D.A., Serhal P. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation // *Hum Reprod*. – 2012. – 25, N 7. – P. 1609–1618.
24. Bronet F., Martorez E., Gaytarn M., Lin˜arn A., Cernuda D., Ariza M., Nogales M. et al. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients // *Hum Reprod*. – 2012. – 27, N 7. – P. 1922–1929.
25. Borini A., Tarozzi N., Bizzaro D., Bonu M.A., Fava L., Flamigni C., Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART // *Hum Reprod*. – 2006. – 21, N 11. – P. 2876–2881.
26. Oleszczuk K., Giwercman A., Bungum M. Intra-individual variation of the sperm chromatin structure assay DNA fragmentation index in men from infertile couples // *Hum Reprod*. – 2011. – 26, N 12. – P. 3244–3248.
27. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 460 с.

**ZHYLKOVA I.S.<sup>1</sup>, FESKOV O.M.<sup>1</sup>, BEZPECHNA I.M.<sup>1</sup>, FEDOTA O.M.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Center of Human Reproduction «Clinic of Professor Feskov O.M.»,  
Ukraine, 61098, Kharkiv, Yelizarova str., 15, email: zhilkova@mail.ru*

<sup>2</sup> *Karazin's Kharkiv National University,  
Ukraine, 61000, Kharkiv, Svobody Square, 4*

## **GENETIC FACTORS OF SPERMATOGENESIS FAILURES IN MEN WITH LOW REPRODUCTIVE FUNCTION**

**Aims.** The correlation of DNA fragmentation level with classic sperm parameters, the male age and the level of immature spermatozoa and sperm aneuploidies was investigated. **Methods.** The level of the sperm DNA fragmentation was measured by the method of sperm chromatin dispersion. Semen aneuploidies were detected by the method of fluorescence in situ hybridization. The level of immature spermatozoa was measured by hyaluron binding assay. **Results.** There is a negative correlation between the DNA fragmentation level and sperm motility and sperm morphology. The significant negative correlation between DNA fragmentation level and immature spermatozoa level is proved. There is a negative correlation between the levels of DNA fragmentation and sperm aneuploidies. **Conclusions.** The failures of sperm DNA compactization influence on classic sperm parameters and correlates with the level of aneuploidies. There is a dependence of DNA fragmentation level on the male age. The critical clinically significant age for DNA fragmentation is 30 years old.

*Key words:* DNA fragmentation, aneuploidy, mature sperm, FISH.

**УДК 616.379 – 008.64 – 053.2 / 5: 575**

**КОВАЛЕВА В.И., БУДРЕЙКО Е.А., ЧУМАК С.А.**

*ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН»,*

*Украина, 61153, г. Харьков, пр. 50-летия ВЛКСМ, 52-А, e-mail:iozdp@iozdp.org.ua*

## **ИММУНОЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕЙ, СТРАДАЮЩИХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ I ТИПА**

Согласно определению экспертов ВОЗ, сахарный диабет (СД) является на сегодняшний день неинфекционной эпидемией. Если вначале 80-х годов прошлого века число больных СД было примерно 30 млн., то сегодня оно достигло более 366 млн., а по прогнозам экспертов Международной диабетической федерации и ВОЗ к 2030 году ожидается более 522 млн. [1]. Численность случаев СД I типа, что регистри-

руется ежегодно в мире, составляет 218000 лиц, ежегодный прирост заболеваемости детей равняется 3 % [2].

За последние два десятилетия достигнут некоторый прогресс в исследованиях генетических основ сахарного диабета. Так, сканирование выявило наличие различных хромосомных областей связанных с развитием сахарного диабета. Согласно генетической этиологии все

случаи заболеваемости диабетом делятся на 3 большие группы: моногенные, полигенные (около 90 % от всех случаев) и митохондриальные (связанные с мутациями в митохондриальной ДНК). Развитие моногенных форм обусловлено мутацией в одном гене. При полигенных формах влияние каждого гена, вовлеченного в развитие диабета, незначительна и генетическая предрасположенность определяется комбинацией аллелей многих генов. Полагают, что в развитие диабета I типа может быть вовлечено от 50 до 100 генов [3]. Известно также, что около 20 генов-кандидатов предрасположенности к СД I типа картировано на хромосоме 11p15 (IDDM2) и 6q15 (IDDM2); кроме того, ген инсулина – на хромосоме 11p15 (IDDM) [4]. В некоторых исследованиях было показано [5], что у человека, родившегося с генетической предрасположенностью, при встрече с провоцирующим фактором окружающей среды возникают иммунологические нарушения в  $\beta$ -клетках – инсулит, проявляющийся появлением аутореактивных Т-клеток и аутоантител, с постепенным разрушением  $\beta$ -клеток, снижением инсулиновой секреции и развитием СД I типа, когда уже погибают 90 % клеток.

В настоящее время накоплено достаточно данных о том, что у носителей мутаций манифестация диабета провоцируется факторами, которые вызывают снижение восприимчивости к инсулину. К ним относятся также и такие состояния, как период активного роста и полового созревания, избыточная масса тела, инфекционный процесс и другие [6].

Среди генетических факторов особое внимание привлекает исследование хромосомного аппарата у больных СД I типа. Данный вопрос изучается [7–10] для определения иммунореактивности организма человека, диагностики иммунодефицитных состояний, для оценки Т-клеточного иммунитета, а также – пролиферативной способности лимфоцитов, так как в активно делящихся клетках ассоциаций нет или они представлены двумя акроцентрическими хромосомами.

Изучение закономерностей образования ассоциаций акроцентрических хромосом (ААХ) человека давно привлекало к себе внимание ученых, однако, впервые этот феномен был описан в 1961 г. Fergusson-Smith и Handmaker и получил название «спутничная ассоциация». Авторы полагали, что если ядрышки в интерфазном ядре имеют тенденцию к слиянию, то этот процесс приводит к взаимной ориента-

ции и сближению коротких плеч акроцентрических хромосом. Данные М.А. Guichaona и соавт. (1986) также свидетельствуют в пользу «конъюгационной» гипотезе образования ААХ [9].

В работе [11], было показано, что у онкологических больных наблюдается повышенная ассоциативная способность хромосом, которая может приводить к нерасхождению акроцентрических хромосом в митозе, вследствие чего могут возникать хромосомные перестройки (реципрокные транслокации, делеции и т.д.).

При изучении частоты вступления хромосом в ассоциации у больных ревматоидным артритом было установлено [12], что среднее число ассоциирующих акроцентрических хромосом на клетку у больных с ревматоидным артритом было в 1,7 раз ниже в сравнении со здоровыми сверстниками, что указывает на снижение пролиферативной активности Т-лимфоцитов.

Учитывая вышесказанное, исследование цитогенетических показателей в лимфоцитах периферической крови детей, больных СД I типа, является необходимым и актуальным, поскольку успешное лечение сахарного диабета определяет с одной стороны прогноз жизни пациентов, а с другой – снижение затрат для лечения этого тяжелого хронического заболевания.

#### **Материалы и методы**

Цитогенетическое исследование выполнено у 23 детей, больных СД I типа и у 40 практически здоровых сверстников. Культивирование лимфоцитов периферической крови проводили по стандартному методу [13]. Продолжительность культивирования с митогеном (Sigma Германия) составила 72 часа. Препараты хромосом окрашивали общепринятым способом GTG – методом с использованием красителя Гимза. От каждого пациента анализировали от 50 до 100 метафаз. Ассоциации акроцентрических хромосом (ААХ) оценивались с помощью критериев, разработанных К.Д. Zang и Е. Back (1968), которые основаны на специфичности расположения ассоциирующих акроцентрических хромосом (АХ) в метафазе: короткие плечи АХ ориентированы по отношению друг к другу и расположение между ними без учета спутников (сателлитов) не превышает размер длинного плеча хромосомы из группы G; при параллельной или дуговой ориентации осей хромосом центромеры ассоциирующих хромосом лежат на одной центромерной линии

(линия, проходящая через центромеру, перпендикулярна оси хромосом). Всего проанализировано 2213 метафаз у больных, страдающих СД I типа и 2319 пластинок у здоровых детей. В исследовании учитывались: уровень ААХ; среднее количество ассоциаций на клетку; общее и среднее число хромосом, участвующих в ассоциации (СЧААХ), распределение ассоциаций по их числу. Коэффициент СЧААХ рассчитывали как отношение общего количества хромосом, вступающих в ассоциации, к общему числу проанализированных клеток. Анализ метафазных пластинок проводили с помощью бинокулярного микроскопа фирмы Leica Galen III (Австрия), окуляр 15×, объектив 100×, бинокулярная насадка 1,25×. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакетов прикладных программ Excel, SPSS «Statistical 17,0».

#### Результаты и обсуждения

С учетом аутоиммунного характера сахарного диабета нами была определена динамика ассоциаций акроцентрических хромосом у больных, страдающих сахарным диабетом I типа, так как частота ААХ является важным показателем реактивности организма, отражающим активность лимфоидных клеток *in vivo*. Всего в ассоциации было вовлечено 1221 акроцентрическая хромосома. Процент клеток с ассоциациями составил  $20,15 \pm 0,85$  %, а среднее количество ассоциаций на клетку – 0,55, что не превышало частоту данного показателя у здоровых лиц – 1,07 [10]. Среднее число ассоциирующихся акроцентрических хромосом (СЧААХ) на клетку составило – 1,81, что в 2,19 раза реже, чем у здоровых сверстников – 3,97 [10].

В анализируемых лимфоцитах периферической крови детей, страдающих СД I типа, частота класса лимфоцитов с различным числом ААХ значительно колебалась. Так, наиболее частыми были ассоциации, состоящие из двух АХ –  $11,70 \pm 0,68$  %, затем ассоциации, состоящие из трех АХ –  $4,02 \pm 0,45$  %, четырех АХ –  $3,25 \pm 0,38$  %, пяти АХ  $0,59 \pm 0,16$  %, шести –  $0,41 \pm 0,14$  % и семи  $0,14 \pm 0,08$  % ААХ. Более частое определение классов лимфоцитов с двумя и тремя ассоциирующимися акроцентрическими хромосомами (КЛ2, КЛ3) можно объяснить тем, что ААХ являются следствием слияния гомологичного ядрышкового материала в интерфазном ядре, поэтому большинство ассоциирующих групп состоит из двух и трех ААХ. При слиянии ядрышек между ЯОР

акроцентриков устанавливается связь, состоящая из белковых, РНК-ковых, ДНК-ковых нитей, причем она прочнее при ассоциации двух или трех, чем более хромосом [14].

Частота ААХ тесно связана с их иммунореактивностью. Наиболее тесно коррелируют с пролиферативной активностью лимфоцитов частота клеток с 0 и 2 ААХ (КЛ0 + 2), отражающая клеточную иммунореактивность, реально имеющуюся на момент обследования *in vivo*. Клетки с 3 и более ААХ (КЛ3 + 10) считаются неактивными, временно интактными, длительно рециркулирующими. У детей, страдающих СД I типа, выявлено снижение способности акроцентрических хромосом вступать в ассоциацию, что приводит, в свою очередь, к уменьшению частоты КЛ0 + 2 и свидетельствует о снижении иммунореактивности организма больных.

По данным [15], в периферической крови больных хламидийной инфекцией происходит перераспределение частот активных (КЛ0 + 2) и неактивных (КЛ3 + 10) лимфоцитов. Так, частота (КЛ0 + 2) увеличивалась и достигала достоверных отличий от показателей в группе больных вне обострения ( $37,7 \pm 2,0$  % и  $26,3 \pm 1,8$  % соответственно;  $p < 0,01$ ) и здоровых лиц ( $34,7 \pm 2,0$  и  $29,6 \pm 1,9$  % соответственно;  $p < 0,05$ ).

В группе обследованных больных количество активированных Т-лимфоцитов с двумя ассоциирующимися акроцентрическими хромосомами составило  $11,70 \pm 0,68$  %, тогда как в популяционном контроле этот показатель равен  $35,0 \pm 2,0$  % ( $p < 0,001$ ) [10], что свидетельствует о снижении пролиферативной активности Т-лимфоцитов. Это позволило нам отнести детей, страдающих СД I типа, к лицам с вторичным иммунодефицитом.

Согласно литературным данным [10], основной причиной снижения частоты КЛ0 + 2 в периферической крови является перераспределение в организме активированных лимфоцитов и временное их депонирование в местах локализации антигенов и развития специфических иммунных реакций.

#### Выводы

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о более низкой, по сравнению со здоровыми сверстниками, ассоциативной способности акроцентрических хромосом у пробандов с СД I типа, что указывает на снижение иммунореактивности организма обследованных нами больных детей.

## Литература

1. Кехіопуло Х.Ф. Оцінка взаємозв'язків між інсулінорезистентністю, ендотеліальною дисфункцією, дисліпідемією, вмістом адипонектину і С-реактивного білка // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. – 2013. – № 3 (44) – С. 41–46.
2. Никонова Т.П. Сахарный диабет 1-го типа и латентный аутоиммунный диабет взрослых (LADA): клинические, иммунологические и гормонально-метаболические аспекты // Международный эндокринологический журнал. – 2011. – № 7 (39). – С. 24–32.
3. Воронько О.С., Бодоев Н.В., Арчаков А.И. Использование SNP-маркеров для оценки индивидуальной генетической предрасположенности к сахарному диабету типа 1 и 2 // Биомедицинская химия. – 2007. – 53, вып. 4. – С. 373–384.
4. Болдырева М.Н., Хаитов Р.М., Дедов И.И., Богатова О.В., Гуськова И.А., Янкевич Т.Э., Зилов А.В., Осокина И.В., Евсеева И.В., Ганичева Л.Л., Кашенин М.Н., Алексеев Л.П. Новый взгляд на механизм HLA-ассоциированной предрасположенности к сахарному диабету 1-го типа. Теоретические и прикладные аспекты // Иммунология. – 2005. – № 6. – С. 324–329.
5. Титович Е.В. Молекулярно-генетические, иммунологические основы и перспективы профилактики сахарного диабета у детей // Проблемы эндокринологии – 2011. – № 1. – С. 9–18.
6. Рахимова Г.Н., Рахимова Д.А. HLA-антигены I класса в группе детей с повышенным риском развития инсулин зависимого сахарного диабета // Мед. иммунология. – 2002. – № 4–5. – С. 633–636.
7. Лебединская Л.А. Изменение вещественного компонента информационно-генетической системы организма у больных рецидивирующим генитальным герпесом // Дерматология и венерология – 2002. – № 4 (18). – С. 52–56.
8. Стабровская Н.В. Функциональная активность рибосомальных генов при детских аллергиях: автореф. дисс.... канд. биол. наук. – Москва, 2010. – 18 с.
9. Храмов А.В., Иванов В.П., Трубникова Е.В., Стабровская Н.В., Бачинский О.Н., Кохтенко Е.В. Многомерный анализ функциональной активности рибосомальных генов при хронической обструктивной болезни легких // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 5. – С. 369–373.
10. Фролов А.К., Арцимович Н.Г., Сохин А.А. Иммуноцитогенетика. – М.: Медицина, 1993. – 240с.
11. Трубникова Е.В. Эпидемиология, цитогенетические эффекты и фенотипические особенности у больных со злокачественными лимфомами: дисс....канд. биол. наук. – Курск, 2006. – 173 с.
12. Багацкая Н.В., Медзяновская Е.В. Особенности ассоциирования акроцентрических хромосом у больных ревматоидным артритом // Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Серія Біологія. – 2011. – Вип. 14, № 971. – С. 71–76.
13. Зерова-Любимова Т.Е., Горовенко Н.Г. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини: методичні рекомендації. – К., 2003. – 25 с.
14. Микельсаар В.И. Структурный полиморфизм хромосом человека: автореф. дисс.... д-ра биол. наук. – М., 1979. – 42 с.
15. Мавров И.И., Лебединская Л.А. Состояние информационно-генетической системы организма больных хламидийной инфекцией // Архив клинической и экспериментальной медицины. – 2003. – 12, № 2. – С. 222–226.

**KOVALEVA V.I., BUDREYKO E.A., CHUMAK S.A.**

*SI "Institute for Children and Adolescents Health Care of the NAMS of Ukraine",  
Ukraine, 61153, Kharkiv, pr. 50-letya VLKSM, 52-A, e-mail:iozdp@iozdp.org.ua*

## **IMMUNOCYTOGENETIC CHARACTERISTICS IN CHILDREN WITH TYPE I DIABETES MELLITUS**

**Aims.** The purpose of our study was to assess associative ability of acrocentric chromosomes (AC) in the peripheral blood lymphocytes of patients with type I diabetes mellitus. **Methods.** The analysis technique was performed according to the standard semimicromethod. Associations of acrocentric chromosomes (AAC) were assessed using D. Lang and E. Back (1968) criteria. **Results.** The results obtained have demonstrated that the number of activated T- lymphocytes with two AAC in children, suffering from type I diabetes, is 11.70 %, whereas in the population control this finding comes to 35.0 %. The average number of AAC per one cell in our patients was 2.19 less frequent than that in healthy age-matched persons and amounted to 1.81 vs. 3.97. **Conclusions.** The findings of our study indicate a lower associative ability of AC in probands with type I diabetes, which allows our authors to refer them to the persons with secondary immunodeficiency.

**Key words:** type I diabetes mellitus, children, acrocentric chromosomes, associations.