

В.В.Грабарь¹
А.М.Феськов¹
А.В.Стефанович²
Е.С.Жилкова¹

¹ Центр репродукции человека «Сана-Мед», Харьков

² ГУ «Научный центр радиационной медицины НАМН Украины», Киев

Ключевые слова: бесплодие, анеуплоидия, сперматозоиды.

Надійшла: 14.09.2014

Прийнята: 23.09.2014

УДК 618.3-06-076.5

АНЕУПЛОИДИЯ В СПЕРМАТОЗОИДАХ У ИНФЕРТИЛЬНЫХ МУЖЧИН

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Исследование факторов женского и мужского бесплодия в отдаленный период после аварии на Чернобыльской АЭС» (номер государственной регистрации 0111U000755).

Реферат. Целью исследования явилось изучение частоты анеуплоидии в сперматозоидах у мужчин бесплодием с нормальным кариотипом и хромосомными изменениями. Использована мультицветная флуоресцентная гибридизация *in situ* в сперматозоидах, которая проведена у здоровых и бесплодных мужчин. Выявлено, что частота хромосомных aberrаций в сперматозоидах наиболее высокая у мужчин с геномными и хромосомными мутациями.

Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 3. – С. 7-12.

© В.В.Грабарь, А.М.Феськов, А.В.Стефанович, Е.С.Жилкова, 2014

✉ lera719@mail.ru

Grabar V.V., Feskov A.M., Stefanovich A.V., Zhilkova E.S. Aneuploidy in spermatozoa in infertile men.

ABSTRACT. Background. An important problem is to investigate the frequency of aneuploidy in sperms of infertile men according to their changes in karyotype, that would allow to understand the contribution of paternal factor in the formation of chromosomal aberrations of embryos. **Objective.** To study the frequency of aneuploidy in spermatozoa from infertile men with normal karyotype and chromosomal changes. **Methods.** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of spermatozoa (chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y) was performed in 79 infertile men with normal karyotype, in 16 with chromosomal abnormalities, in 18 with chromosomal polymorphism and in 29 healthy men. In total 23,867 of sperm cores were analyzed. **Results.** In men with infertility aneuploid sperms were in 5.7 times more often than in fertile patients ($P < 0,01$). An aneuploidy of sperms in infertile men with a chromosomal abnormality were in 2.1 times, with a chromosomal polymorphism in 1.4 times more often than in infertile patients with a normal karyotype ($P < 0,05$). In all patients the most common aneuploidies were in chromosomes XY, 21 and 22. The study of aneuploidy frequency in spermatozoa at different variants of chromosomal pathology showed that in men with paracentric inversions rate was 5.75 - 7.65%, whereas in patients with quantitative and other structural chromosomal abnormalities it was above 11.73 - 17.82%. **Conclusion.** The frequency of chromosomal aberrations in spermatozoa is highest in men with genomic and chromosomal mutations. In infertile patients with changes in the karyotype the gametes with mutations *de novo* can be produced.

Key words: infertility, aneuploidy, spermatozoa.

Citation:

Grabar VV, Feskov AM, Stefanovich AV, Zhilkova ES. [Aneuploidy in spermatozoa in infertile men]. *Morphologia.* 2014;8(3):7-12. Russian.

Введение

Как известно, хромосомные аномалии эмбриона и плода являются главной причиной репродуктивных неудач [1]. Исследование эмбрионов зачастую затруднительно из-за их ранней гибели при анеуплоидии [2], а возможности диагностики хромосомной патологии *in vivo* возможны только в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). В связи с этим актуальным является исследование гамет на предмет анеуплоидии, что позволит прогноиро-

вать риск хромосомной патологии у эмбриона. Известно, что частота аномалий кариотипа по данным исследования лимфоцитов у бесплодных мужчин в 2-3 раза выше, чем у инфертильных женщин и составляет в среднем 10 % [3, 4]. Нам представляется актуальным исследовать частоту анеуплоидии в сперматозоидах у мужчин в зависимости от выявленных у них изменений кариотипа, что позволило бы понять вклад отцовского фактора в формирование хромосомной патологии эмбрионов. Существующие исследования в

этой области носят фрагментарный характер и нуждаются в детализации.

Цель – изучить частоту анеуплоидии в сперматозоидах у мужчин бесплодием при нормальном кариотипе и при хромосомных изменениях.

Материалы и методы

Нами сравнивалась частота анеуплоидии в сперматозоидах у здоровых мужчин, которые участвовали в программах ВРТ как мужья фертильных женщин, и у пациентов с бесплодием (с нормальным кариотипом, хромосомной патологией и хромосомным полиморфизмом).

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) сперматозоидов проведена у 79-ти мужчин с бесплодием и нормальным кариотипом (группа 1), у 16-ти с хромосомными нарушениями (в 7-ми случаях анеуплоидия, в 9-ти – хромосомные aberrации) (группа 2), у 18-ти с хромосомным полиморфизмом (группа 3) и у 29-ти здоровых мужчин с нормальными параметрами спермограммы (группа 4). Всего было проанализировано 23867 ядер сперматозоидов. Критерием отбора мужчин в группы 1, 2 и 3 было наличие выраженных спермиологических нарушений - необструктивной азооспермии, олигоспермии, олигоастенозооспермии, олигоастенотератозооспермии. Всем пациентам проводилось цитогенетическое исследование. Пациенты не имели возрастных различий, соответственно в группе 1 - 36,9±4,2, 2 - 37,8±2,8, 3 - 37,4±3,9, 4 - 36,5±3,1 лет.

У 10,1 % мужчин в группе 1, у 31,3 % в группе 2, у 38,9 % в группе 3 сперматозоиды были получены с помощью биопсийных методик. Таким образом, у мужчин с патологией кариотипа инвазивные методики приходилось применять в 3 раза чаще, в каждом 3-м случае, что связано с высокой частотой необструктивной азооспермии. Несмотря на дилуцию нативной спермы для проведения исследования, среднее число спермиев на 1 фертильного мужчину было в 1,8 раз больше, чем в группе 1, в 2,9 раз больше, чем в группе 2, в 2,4 раза больше, чем у пациентов группы 3 ($P < 0,05$).

Эякулят мужчин контрольной группы (группа 4) разводился до концентрации $0,5-0,1 \times 10^6$ /мл; эякулят инфертильных пациентов не разводился. Подготовку эякулята, денатурацию, прегибризационную подготовку и гибридизацию проводили согласно стандартному протоколу Vysis (США) [5]. Мультицветная FISH проводилась в 2 этапа, так как небольшие размеры головки сперматозоида не позволяли корректно различить большое количество цветных сигналов из-за их взаимного наложения. На первом этапе исследовались хромосомы 13, 16, 18, 21 и 22 (использовался MultiVysion™ PB (Abbott), кото-

рый включал LSI® 13 (13q14, маркированный Spectrum- Red™), CEP® 16 (satellite II D16Z3, маркированный SpectrumAqua™), CEP® 18 (alphasatellite D18Z1, маркированный SpectrumBlue™), LSI® 21 (21q22.13–21q22.2, маркированный SpectrumGreen™) и LSI® 22 (22q11.2, маркированный SpectrumGold™). На последующем втором этапе исследовались хромосомы X и Y применялись ДНК-зонды (CEP X (DXZ1) Alpha Satellite DNA Spectrum Aqua, CEP Y (DYZ3) Alpha Satellite DNA Spectrum Orange, Vysis (США)). Для визуализации анализа был использован флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse 80i, оборудованный соответствующим набором фильтров Vysis и системой автоматического анализа изображения ISIS, разработанной фирмой Metasystem; микроскопия проводилась при увеличении $\times 600$. Для документирования результата применялась цитогенетическая программа Lucia FISH (LIM, Чехия).

Анеуплоидия сперматозоидов при FISH регистрировалась, если определялось количество флуоресцентных сигналов одной хромосомы отличное от гаплоидного. Количество проанализированных сперматозоидов зависело от концентрации сперматозоидов в 1 мл эякулята. У пациентов с азооспермией, выраженной олигозооспермией были проанализированы все доступные для анализа сперматозоиды, у мужчин с нормозооспермией было проанализировано не меньше тысячи сперматозоидов.

Статистическую обработку результатов проводили по t-критерию в программе STATISTICA, а также по χ^2 в программе STATGRAF. Достоверными считали различия при значениях с вероятностью $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Сравнение уровня анеуплоидии сперматозоидов в изучаемого контингента с помощью χ^2 показало, что у мужчин с бесплодием их частота достоверно выше ($P_{1,2,3-4} < 0,01$). Сравнение частоты анеуплоидии сперматозоидов в группах мужчин с нормальным кариотипом (группа 1), с хромосомной патологией (группа 2) и с хромосомным полиморфизмом (группа 3) показало достоверное увеличение частоты анеуплоидий у инфертильных пациентов с изменениями кариотипа ($P_{2,3-1} < 0,01$) (табл. 1).

Результаты исследования встречаемости анеуплоидий по изучаемым хромосомам XY, 13, 16, 18, 21, 22 представлены в таблице 2.

В связи с тем, что соотношение сперматозоидов с хромосомой X и сперматозоидов с хромосомой Y было равным (1:1) как у здоровых, так и у инфертильных мужчин, приведены единичные показатели анеуплоидии по половым хромосомам.

Таблица 1

Частота анеуплоидий в сперматозоидах мужчин с бесплодием (группы 1, 2, 3) и среди здоровых мужчин

	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Всего исследовано сперматозоидов	11386 (100 %)	1712 (100 %)	2137 (100 %)	8632 (100 %)
Кол-во гаплоидных	10578 (92,90 %)	1459 (85,23 %)	1927 (90,18 %)	8506 (98,54 %)
Кол-во с аномальным хромосомным набором	808 (7,10 %)	253 (14,77 %)	210 (9,82 %)	126 (1,46 %)
χ^2	350	726	396	303
P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Таблица 2

Результаты исследования анеуплоидии сперматозоидов методом FISH по хромосомам XY, 13, 16, 18, 21, 22

		Группы мужчин				
		Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	
Общее количество сперматозоидов n=23867		11386 (100 %)	1712 (100 %)	2137 (100 %)	8632 (100 %)	
Количество сперматозоидов с анеуплоидией n=1397		808 (7,10 %)	253 (14,77 %)	210 (9,82 %)	126 (1,46 %)	
Хромосомные aberrации	Анеуплоидии	по X и Y (%)	201	61	53	40
		n=355	1,77 %	3,56 %	2,48 %	0,46 %
		13 (%), n=202	1,10 %	2,11 %	1,26 %	0,16 %
		16 (%), n=86	0,45 %	0,76 %	0,70 %	0,08 %
		18 (%), n=116	0,54 %	1,40 %	0,98 %	0,10 %
		21 (%), n=273	1,35 %	2,80 %	2,11 %	0,30 %
		22 (%), n=251	1,29 %	2,57 %	1,92 %	0,22 %
		Множественные анеуплоидии* (%) n=176	0,92 %	1,87 %	1,17 %	(0,16 %)
	Диплоидии n=114	0,60 %	(1,58 %)	(0,37 %)	(0,1 %)	
P		0,05	0,05	0,05	0,05	

Примечание: * - дана суммарная частота множественных анеуплоидий. Хромосомы, вовлеченные в множественную анеуплоидию, регистрировались по каждой хромосоме отдельно.

Таким образом, во всех группах мужчин с бесплодием и у здоровых мужчин наиболее часто встречалась анеуплоидия половых хромосом XY, 21-й и 22-й хромосом (соответственно в группе 1 – 1,77 %, 1,35 % и 1,29 %; в группе 2 – 3,56 %, 2,80 % и 2,57 %; в группе 3 – 2,48 %, 2,11 % и 1,92 %; в группе 4 – 0,46 %, 0,30 % и 0,22 %) (P<0,05).

Вероятно, одним из объяснений высокого уровня анеуплоидии по половым хромосомам являются особенности кроссинговера хромосом X и Y, в результате чего во время мейоза гоносомы чаще подвержены хромосомным аномалиям по сравнению с другими хромосомами. Высокую частоту анеуплоидии 21-й и 22-й хромосом, вероятно, можно объяснить тем, что малые акро-

центрические хромосомы формируют небольшие хиазмы во время мейоза I, а низкие уровни рекомбинации могут предрасполагать к их нерасхождению [2].

Далее по частоте следовала анеуплоидия по 13-й, затем по 18-й и реже других встречалась анеуплоидия по 16-й хромосоме. Как видно из таблицы 3 в каждом седьмом-восьмом случае анеуплоидии в сперматозоидах были комплексными. Из комплексных хромосомных аномалий наиболее часто встречалась анеуплоидия 13-й и 21-й, 21-й и 22-й, 16-й и 18-й хромосомы; зафиксирована также анеуплоидия по трем хромосомам – 16, 21 и 22; 16, 18 и XY.

В наших наблюдениях сперматозоиды с нередуцированным, диплоидным числом хромосом

встречались в 114 случаях (0,48 %, n=23867). Как известно, формирование триплоидного эмбриона чаще связано с диандрией вследствие оплодотворения ооцита двумя сперматозоидами из-за неэффективного блока полиспермии [1]. И гораздо реже триплоидные эмбрионы формируют-

ся вследствие созревания диплоидных сперматозоидов, что также подтверждают наши данные.

Результаты исследования частоты анеуплоидии в сперматозоидах у мужчин с хромосомной патологией представлены в таблице 3.

Таблица 3

Частота встречаемости анеуплоидии по хромосомам 13, 16, 18, 21, 22 и XY у мужчин с хромосомной патологией

Кариотип (количество случаев)	Средняя частота анеуплоидии в сперматозоидах						
	Общая частота (%)	XY (%)	13 (%)	16 (%)	18 (%)	21 (%)	22 (%)
47,XXY (2)	15,93±0,19	6,47±0,14	1,95±0,09	0,85±0,11	1,37±0,10	3,0±0,17	2,29±0,13
47,XY (1)	13,56	4,92	1,84	0,72	1,19	2,57	2,32
47,XXY/46,XY (2)	13,39±0,32	3,96±0,18	2,03±0,28	0,76±0,08	1,48±0,15	2,65±0,11	2,51±0,12
45,X/46,XY (1)	13,62	3,85	1,94	0,91	1,56	2,79	2,57
47,XY, + mar/46,XY (1)	11,73	2,79	2,36	0,63	1,15	2,31	2,49
45,XY, der, (13;14)(q10; q10) (1)	16,47	4,21	2,67	0,90	1,27	3,64	3,78
46,XY,t(9;15)(q21;p11) (1)	17,82	4,18	2,60	1,25	1,94	4,23	3,62
46,XY,inv(Y)(p11;q12) (1)	16,51	3,86	2,82	0,95	1,68	3,99	3,21
46,XY,inv(9)(p11q12) (2)	16,40±0,54	3,95±0,31	2,93±0,17	0,79±0,25	1,85±0,09	3,52±0,20	3,36±0,52
46,XY,inv(9)(p11q13) (1)	16,22	3,70	2,57	1,0	1,96	3,41	3,58
46,XY,inv(11)(q.21;q23) (1)	5,75	1,27	0,90	0,28	0,83	1,29	1,18
46,XY, inv (7)(q22q34) (1)	7,65	1,62	1,56	0,53	0,97	1,50	1,47
46,XY,inv(7)(q11;q22) (1)	6,53	1,49	1,29	0,36	0,78	1,36	1,25

Как видно из таблицы 3, у пациентов синдромом Клайнфельтера (47,XXY) частота анеуплоидных сперматозоидов составляет 15,93±0,19 %, при мозаичной форме этого синдрома (47,XXY/46,XY) - 13,39±0,32 %. Вполне объяснимо, что в сперматозоидах этих пациентов повышена частота анеуплоидии XY. В процессе мейоза у этих пациентов формировались дисомные по гоносомам гаметы (при полной форме с частотой 6,47±0,14 %, при мозаичной - 3,96±0,18 %). Кроме того, вероятно, повышение частоты анеуплоидии у этих мужчин также может быть связано с изменением микросреды в гонадах в связи с гипергонадотропным состоянием, что также оказывает влияние на хромосомную сегрегацию в мейозе в сперматоцитах I порядка.

У инфертильного мужчины с кариотипом 47,XY (1) общая частота анеуплоидии была 13,56 %, по хромосомам XY - 4,92 %. В ряде исследований предполагается, что у пациентов с кариотипом 47,XY происходит потеря избыточной хромосомы Y и в дальнейшем в сперматогенезе сперматоциты ведут себя как эуплоидные [6]. Однако, большее количество работ указывают на то, что сперматоциты с кариотипом 47,XY проходят через фазы мейоза, производя анеуплоид-

ные гаметы [4].

У мужчины с кариотипом 45,X/46,XY общая частота анеуплоидии сперматозоидов составила 13,62 %, по гоносомам 3,85 %, при этом объяснимо чаще формировались нуллисомные гаметы.

Наши исследования показывают, что у пациентов с аномалиями в системе половых хромосом также повышена частота анеуплоидии по аутосомам. Повышение частоты анеуплоидии в сперматозоидах у мужчин с аномалиями в системе половых хромосом подтверждает существование так называемого интерхромосомного эффекта, согласно которому в процессе мейоза частота анеуплоидий по аутосомам повышается при наличии в кариотипе аномалий в системе половых хромосом и наоборот [7].

Как мы видим из таблицы 3, частота анеуплоидии при инверсиях зависела от ее типа – периферической или парацентрической и от длины инвертированного сегмента. Так, при периферических инверсиях частота анеуплоидии была выше, чем при парацентрических, видимо, в связи с тем, что при периферических перестройках нарушается процесс формирования хиазмы и последующая сегрегация хромосом. У бесплодных мужчин с периферическими инверсиями

(46,XY,inv(Y)(p11;q12); 46,XY,inv(9)(p11;q12; 46,XY,inv(9)(p11;q13)) общая частота анеуплоидии в сперматозоидах составила – соответственно 16,51 %, 16,40±0,54 % и 16,22 %. При парацентрических инверсиях в наших наблюдениях уровень анеуплоидных сперматозоидов был самым низким, и составлял 5,75-7,65 % (кариотипы бесплодных мужчин 46,XY,inv(11)(q.21;q23); 46,XY, inv (7)(q22q34); 46,XY,inv(7)(q11;q22)).

По данным [8], частота формирования анеуплоидных сперматозоидов зависит от длины инвертированного сегмента. При длине инвертированного сегмента более 100 Mbp частота анеуплоидий в сперматозоидах составляет около 50 %, и носители таких хромосомных перестроек имеют высокий репродуктивный риск. При длине инвертированного сегмента менее 50 Mbp частота анеуплоидии в сперматозоидах возрастает незначительно.

У инфертильного мужчины с реципрокной транслокацией 46,XY,t(9;15)(q21;p11) общая частота анеуплоидии в сперматозоидах составила 17,82 %, что было выше, чем у пациентов с другими численными и структурными изменениями хромосом. Скорее всего, это частота была бы выше при расширении количества зондов, в том числе по хромосомам 9 и 15, однако, технические возможности лаборатории не позволили это сделать. Результаты нескольких исследований показывают достаточно разнородную частоту анеуплоидии у носителей реципрокных транслокаций – от 18,6 до 62,8 % [9]. Вероятнее всего на эти показатели оказывают влияние типы хромосомных перестроек, однако, нельзя исключить и методологические и технические различия, к одним из которых относятся погрешности мультицветной FISH в пределах небольших размеров

головки сперматозоидов, из-за которых флуоресцентные сигналы могут наслаиваться, что приводит к неверной оценке.

У носителя робертсоновской транслокации (45,XY, der,(13;14)(q10; q10)) сперматозоидов с несбалансированным гаплоидным набором было 16,47 %. Согласно литературным данным, частота сбалансированных гамет при робертсоновских транслокациях имеет довольно широкий диапазон – от 60 до 93 % [8], вероятно на результаты исследований оказывают влияние такие технические особенности, как протоколы подготовки эякулята, FISH, различные ДНК зонды.

Таким образом, наши исследования показали, что количественные и структурные перестройки, выявленные при цитогенетическом исследовании лимфоцитов периферической крови у бесплодных мужчин влияют на нарушение сегрегации хромосом в сперматогенезе. В связи с этим у инфертильных пациентов с нарушениями в кариотипе могут формироваться гаметы с мутациями de novo, использование которых в программах ВРТ может привести к рождению детей с хромосомной патологией.

Выводы

Частота хромосомных aberrаций в сперматозоидах у инфертильных мужчин выше, чем у здоровых. Среди бесплодных мужчин с изменениями кариотипа уровень анеуплоидных сперматозоидов выше, чем при нормальном кариотипе.

Перспективы дальнейших исследований

Перспективным является выяснение связи между уровнем анеуплоидии в сперматозоидах и формированием анеуплоидии у эмбрионов в программах ВРТ, что позволит оценить роль отцовского фактора в формировании хромосомной патологии у потомства.

Литературные источники

References

1. Baranov VS, Kuznetsova TV. [Cytogenetics of human embryonic development: Research and Practical Aspects]. SPb: N-L; 2007. 640 p. Russian.
2. Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. Hum Mol Genet. 2007 Oct 15;16 Spec No. 2:R203-8. doi: 10.1093/hmg/ddm243. PMID: 17911163.
3. Esteves SC. A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility. J Hum Reprod Sci. 2013 Jul;6(3):176-82. doi: 10.4103/0974-1208.121419. PMID: 24347931; PMCID: PMC3853873.
4. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. Reprod Biomed Online. 2007 Jun;14(6):734-45. doi: 10.1061/S1472-6483(10)606773. PMID: 17579990.
5. Liehr T, Weise A, Hamid AB, Fan X, Klein E, Aust N, Othman MA, Mrasek K, Kosyakova N. Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. Expert Rev Mol Diagn. 2013 Apr;13(3):251-5. doi: 10.1586/erm.12.146. PMID: 23570403.
6. Cinar C, Yazici C, Ergünsu S, Beyazyürek C, Javadova D, Sağlam Y, Tarcan T, Güney AI. Genetic diagnosis in infertile men with numerical and constitutional sperm abnormalities. Genet Test. 2008 Jun;12(2):195-202. doi: 10.1089/gte.2007.0056. PMID: 18554162.
- Douet-Guilbert N, Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, Braekeleer MD, Morel F. Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. Int J Androl. 2005 Dec;28(6):372-9. doi: 10.1111/j.1365-2605.2005.00571. PMID: 16300670.

7. Anton E, Vidal F, Blanco J. Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. Hum Reprod. 2007 Aug;22(8):2088-92. doi: 10.1093/humrep/dem152. PMID: 17573525.

8. Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. Cytogenet Genome Res. 2005;111(3-4):281-90. doi: 10.1159/000086901. PMID: 16192706.

Грабар В.В., Феськов О.М., Стефанович Г.В., Жилкова Е.С. Анеуплоїдія в сперматозоїдах у інфертильних чоловіків.

Реферат. Метою дослідження було вивчення частоти анеуплоїдії в сперматозоїдах у чоловіків безпліддям з нормальним каріотипом і з хромосомними змінами. Використана мультикольорова флуоресцентна гібридизація *in situ* в сперматозоїдах, яка проведена у здорових і безплідних чоловіків. Виявлено, що частота хромосомних аберацій в сперматозоїдах найбільш висока у чоловіків з геномними і хромосомними мутаціями.

Ключові слова: безпліддя, анеуплоїдія, сперматозоїди.