

Частота встречаемости гамет с анеуплоидией у мужчин с нарушением репродуктивной функции и патозооспермией

Гордеева Е.Г., Сорокина Т.М., Шилейко Л.В., Остроумова Т.В.,
Борзова О.С., Магомедова Х.Д., Кузина Н.Ю., Баркова О.В., Курило Л.Ф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук.
Москва, 115478, ул. Москворечье, 1. Факс: +7(499)324-07-02; e-mail: gordeyevae@gmail.com

Методом двух- и трёхцветной FISH проведена оценка частоты анеуплоидии по хромосомам 13, 18, 21, X и Y в сперматозоидах у мужчин с астенотератозооспермией (АТ) и олигоастенотератозооспермией различной тяжести (ОАТ I—III). У большинства обследованных мужчин направлятельными диагнозами являлись бесплодие или привычное невынашивание беременности у супруги; в некоторых случаях в анамнезе было отмечено наличие хромосомной патологии у эмбриона/плода. Наши результаты свидетельствуют о том, что повышенная частота мейотического нерасхождения хромосом может сопровождаться умеренной или тяжёлой формой олигоастенотератозооспермии у мужчин с нарушением репродуктивной функции. В среднем среди пациентов с ОАТ I—III частота встречаемости сперматозоидов с дисомией по хромосомам 13, 18, 21, и с XX, XY или YY дисомией достигает 0,28, 0,13, 0,59, 0,1, 0,64 и 0,16% соответственно.

Ключевые слова: нерасхождение хромосом, анеуплоидия гамет, нарушения сперматогенеза

Введение

В ходе сперматогенеза у человека естественным образом происходит формирование числовых и структурных хромосомных аномалий (ХА). В своей работе с использованием метода FISH M. Guttenbach с соавторами показали, что у здоровых фертильных мужчин могут быть обнаружены гаметы с хромосомным дисбалансом [16]. По оценке С. Templado с соавторами, у здоровых фертильных мужчин в среднем частота встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией по хромосомам всего ряда в совокупности составляет 4,5% [31].

Частота встречаемости гамет с анеуплоидией по аутосомам и гоносомам может варьировать от 0,03 до 0,75% у здоровых фертильных мужчин с нормозооспермией [2]. Наиболее высокие значения частот встречаемости зрелых мужских половых клеток (ПК) с анеуплоидией характерны для дисомии по хромосоме 21 [28] и для вариантов дисомии по половым хромосомам [29, 30]. Прежде всего, это связано с особенностями структуры хромосом и наличием предрасположенности к мейотическому нерасхождению акроцентрических хромосом из групп D, G и половых X- и Y-хромосом.

У мужчин при патозооспермии в ходе сперматогенеза могут наблюдаться аномалии мейотического деления ПК, цитокинеза и анафазного расхождения хромосом в I и II мейозе. В ранних работах по исследованию закономерностей сперматогенеза у человека и у некоторых видов млекопитающих было отмечено, что аномальное течение мейотического деления ПК является одной из причин грубых нарушений в развитии гамет и причиной формирования сперматозоидов с атипичной морфологией [3]. К настоящему моменту найдены подтверждения предположения, что в ряде случаев развитие олиго-

зооспермии у пациентов с бесплодием обусловлено аномалиями мейотической рекомбинации, которые сопровождаются признаками частичного блока сперматогенеза на стадиях профазы I мейоза и повышенной частотой мейотического нерасхождения хромосом [25].

Среди мужчин с нарушениями сперматогенеза, тератозооспермией, олигозооспермией в сочетанной или изолированных формах частота встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией может значительно превосходить частоту встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией в группе здоровых фертильных мужчин с нормозооспермией [27]. В современных работах показано, что при некоторых формах патозооспермии частота встречаемости сперматозоидов с дисомией или с диплоидным хромосомным набором может достигать 1,5—62%, что предопределяет высокий риск по невынашиванию беременности или рождению ребёнка с хромосомной патологией [18].

Целью настоящей работы стала оценка частот встречаемости сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором и с анеуплоидией по хромосомам 13, 18, 21, X и Y у мужчин с различными формами патозооспермии.

Материалы и методы

Выборка пациентов

Мужчины, проходящие клиничко-лабораторное обследование с целью планирования деторождения или по поводу бесплодия в браке, составили группы обследуемых, всего 55 пациентов в возрасте от 25 до 54 лет (в среднем 36 ± 7 лет). Согласно принятому протоколу об-

следования мужчин с нарушением репродуктивной функции, проводили спермиологический анализ (СА) и анализ кариотипа [4]. У всех мужчин установлен нормальный мужской кариотип 46,XY, в одном случае выявлено наличие индуцированных ионизирующим излучением ХА (табл. 1).

Согласно заключению по СА, пациенты разделены на 2 группы:

- 1-я группа — мужчины (27 чел.) с олигоастенотератозооспермией различной тяжести (с лёгкой формой — ОАТ I, с умеренной формой — ОАТ II, и с тяжёлой формой — ОАТ III);

- 2-я группа — мужчины (28 чел.) с астенотератозооспермией (АТ).

Выбор пациентов для исследования происходил случайным образом, в связи с чем 2 группы составили муж-

чины с наиболее часто встречающимися сочетанными формами патозооспермии, с АТ и ОАТ. Выраженных форм тератозооспермии с преобладанием одного типа аномалий морфологии ПК или с мономорфной атипией ни в одном случае выявлено не было.

Из обратившихся мужчин с отягощённым акушерским анамнезом у супруги, со случаями ХА у эмбриона, плода или новорождённого условно выделена 3-я группа обследованных (8 чел.), данные анамнеза представлены в табл. 1. У 53 пациентов направительным диагнозом было ПНБ у супруги неясной этиологии, первичное или вторичное бесплодие (Б-I, Б-II). У двух пациентов в анамнезе их жён отмечен единственный случай спонтанного аборта на ранних сроках беременности. У шести пациентов из 2-й группы в анамнезе отмечены неудачные попытки ЭКО/ИКСИ.

Частота встречаемости сперматозоидов с дисомией по хромосомам 13, 18, 21, X и Y (%) у мужчин из 3-й группы

Таблица 1

№ п/п	Направительный диагноз пациента, заключение по СА, возраст и другие сведения	Данные репродуктивного анамнеза	Частота встречаемости ПК с дисомией по хромосомам, %						Диплоидные ПК, %
			13	18	21	XX	XY	YY	
1	ПНБ, АТ, 41 год	Две замершие беременности, кариотип плода — 69,XXX; 69,XXY, пара имеет общего здорового ребёнка	0,08	0,3	0,26	0,17	0,08	0,3	0,67
2	АТ, 30 лет, частичная делеция в субрегионе AZFc (del sY1192)	1 случай замершей беременности, рождение ребёнка с ХА, кариотип — 45,X[6]/49,YYYYY[19] (GTG-окрашивание) nuc ish (DXZ1x1, DYZ3x4)[97]/(DXZ1x1, DYZ3x3)[23]/(DXZ1x1, DYZ3x2)[12]/(DXZ1x1, DYZ3x1)[2]/(DXZ1x1)[36], частичная делеция в субрегионе AZFc (del sY1192) у пробанда и ребёнка	0,1	0,04	0	0,21	0,13	0,08	0,4
3	ПНБ, АТ, 42 года, наличие хромосомного варианта у супруги — 46,XX,9qh+	8 выкидышей, при последнем отмечена анэмбриония, кариотип плода — 46,XX	0,16	0,05	0,26	0,05	0,29	0,05	0,24
4	Б-I, АТ, 29 лет	Замершая беременность, кариотип плода — 47,XXX	0,22	0,04	0,17	0	0,11	0	0,12
5	Б-II, АТ, 41 год	Рождение ребёнка с синдромом Дауна, кариотип — 47,XX,+21	0,15	0,07	0,42	0	0,58	0,11	3,19
6	Б-II, АТ, 35 лет	Прерванная беременность, кариотип плода — 47,+21	0,11	0,12	0,68	0,25	0,04	0,08	0,17
7	Б-I, АТ, 41 год, В 1996 г. мужчина проходил курс химиотерапии и лучевой терапии по поводу лимфогранулематоза. У мужчины обнаружены аберрации хромосом, кариотип — 46,XY,6%, частота разрывов хроматид — 0,12 на 1 клетку (6 ХА, 2 одиночных фрагмента, 2 парных фрагмента, транслокация 44,XY,t(14;?),-16,-20, дупликация 18 — 46,XY,dup18(q21;q23))	3 безуспешные попытки проведения ЭКО, при ПГД в последнем цикле ЭКО у трёх эмбрионов обнаружены ХА: 1-й эмбрион — тетрасомия 13, трисомия ХХУ; 2-й эмбрион — трисомия 13, трисомия ХХУ; 3-й эмбрион — трисомия 13, трисомия 21	0,07	0,06	0,33	0,06	0,09	0	0,24
8	ПНБ, АТ, 46 лет	1-й эмбрион — трисомия 18; 2-й эмбрион — трисомия 16	0,24	0,06	0,34	0,03	0,11	0,08	0,15

В задачи настоящей работы не входило выяснение причин развития патозооспермии у пациентов, но отметим, что и в 1-й, и 2-й группах в трёх случаях выявлены делеции в субрегионах AZF локуса Y-хромосомы.

В качестве контрольной группы обследовано 11 мужчин — доноров спермы в возрасте 25—45 лет. Референсные значения частот встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией для здоровых мужчин с нормозооспермией и нормальным кариотипом 46,XY получены ранее [2].

Методы исследования

Препараты сперматозоидов получали сразу после спермиологического анализа, который выполняли по стандартной методике (WHO, 1999) [34]. Образцы эякулята после инкубации 30 мин при 37°C, после центрифугирования 280 g 10 мин отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.2). Осадок ресуспендировали и фиксировали стандартным способом с тремя сменами фиксатора. Пробу раскапывали на охлаждённые предметные стекла. Деконденсацию хроматина головки сперматозоидов проводили при инкубации препарата 2—5 мин в растворе дитиотреитола (5 mM DTT, pH 8.0).

Для каждого пациента проводили анализ по пяти хромосомам методом двух- и трёхцветной FISH. Для двухцветной FISH использовали смесь локуспецифичных ДНК-зондов на хромосомы 13 и 21: LSI 13, локус гена ретинобластомы RB-1, 13q14, Spectrum Green, LSI 21, локусы D21S259, D21S341, D21S342, 21q22.13-q22.2, Spectrum Orange. Трёхцветную FISH проводили со смесью ДНК-зондов, специфичных к α -сателлитным последовательностям центромерного и прицентромерного гетерохроматина хромосом 18, X и Y: CEP 18, локус D18Z1, 18p11.1-q11.1, Spectrum Aqua, CEP X, локус DXZ1, Xp11.1-q11.1, Spectrum Green, CEP Y, локус DYZ3, Yp11.1-q11.1, Spectrum Orange. Денатурацию, гибридизацию и постгибридизационную отмывку препаратов проводили по протоколу фирмы-производителя (Abbott Molecular Vysis Inc., U.S.A).

Анализ сигналов выполняли на флуоресцентном микроскопе Zeiss Axio Imager.A2 (Carl Zeiss, Jena, Germany), оснащённом набором фильтров для детекции флуоресценции красителей DAPI, AQUA, FITC, Spectrum Orange. Применяли критерии цитогенетического анализа ПК, разработанные Williams с соавторами [39]. Диплоидными считали клетки с двумя сигналами на каждую гомологичную хромосому, т.е. ПК считали диплоидными при наборе сигналов 13-13-21-21 или 18-18-X-X, 18-18-X-Y и 18-18-Y-Y. В ходе работы были обнаружены сперматозоиды, имеющие тетраплоидные и триплоидные хромосомные наборы, которые в анализе данных не учтены.

На каждом препарате анализировали не менее 2000 сперматозоидов. Репрезентативность выборки определена нами, согласно статистическому обоснованию величины выборки при исследовании редких собы-

тий, предложенному Н.А. Плохинским [5]. При концентрации сперматозоидов менее 1 млн/мл анализировали все обнаруженные на препарате зрелые ПК, 100—2000 или более ПК. При анализе данных частоты нуллисомий не учитывали.

Статистический анализ проводили с использованием критерия Пирсона для проверки гипотезы о связи двух переменных и критерия Манна—Уитни для сравнения частот анеуплоидий в программе БИОСТАТ [1]. Значение $p < 0,01$ выбрано как статистически значимое.

Результаты

В ходе работы проанализировано 270 894 сперматозоида. Средние по группам значения частот сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором, с дисомией по хромосомам 13 и 21 представлены в табл. 2. Частоты сперматозоидов с дисомией по хромосомам 13 и 21 в 1-й группе имеют статистически значимые отличия от референсных значений ($p < 0,01$). Частоты сперматозоидов с дисомией по хромосомам 13 и 21 во 2-й группе не имеют статистически значимых отличий от референсных значений ($p = 0,14$, $p = 0,25$). Частоты сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором в 1-й и 2-й группе не имеют статистически значимых отличий от референсных значений ($p = 0,02$, $p = 0,98$).

Средние по группам значения частот сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором, с дисомией по хромосоме 18, а также с XX-, XY- или YY-дисомией представлены в табл. 3. Частоты сперматозоидов с дисомией по хромосоме 18 в 1-й группе имеют статистически значимые отличия от референсных значений ($p < 0,01$). Частоты сперматозоидов с дисомией по хромосоме 18 во 2-й группе не имеют статистически значимых отличий от референсных значений ($p = 0,03$). Частоты сперматозоидов с XX- и XY-дисомией в 1-й группе имеют статистически значимые отличия от референсных значений ($p < 0,01$). Частоты сперматозоидов с YY-дисомией в 1-й группе не имеют статистически значимых отличий от референсных значений ($p = 0,02$). Частоты сперматозоидов с XX-, XY- или YY-дисомией во 2-й группе не имеют статистически значимых отличий от референсных значений ($p = 0,55$, $p = 0,06$, $p = 0,3$). Частоты сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором в 1-й группе имеют статистически значимые отличия от референсных значений ($p < 0,01$). Частоты сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором во 2-й группе не имеют статистически значимых отличий от референсных значений ($p = 0,34$). Распределение X- и Y-несущих сперматозоидов в 1-й, 2-й и контрольной группах соответствовало ожидаемому соотношению 1:1.

Мы наблюдали различия по частоте встречаемости ПК с дисомией по тем или иным хромосомам во всех группах пациентов. Так, частоты сперматозоидов с дисомией по X- и Y-хромосомам суммарно (XX+XY+YY-дисомия) в 1-й, 2-й и в контрольной

группах имеют статистически значимые отличия от значений частот дисомии по хромосоме 18 ($p < 0,01$) (табл. 3). Частоты сперматозоидов с дисомией по хромосоме 21 в 1-й, 2-й и контрольной группах имеют статистически значимые отличия от значений частот дисомии по хромосоме 13 ($p < 0,01$) (табл. 2).

Отметим также, что в 1-й и 2-й группах среди пациентов мы наблюдали широкий разброс значений (R) частот сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором и с анеуплоидией по каждой из хромосом 13, 21, X или Y (табл. 2, 3).

Для 3-й группы нами представлены индивидуальные значения частот встречаемости сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором и с дисомией по хромосомам 13, 18, 21, X и Y (табл. 1).

Обсуждение

Частота встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией при различных формах патозооспермии

Согласно полученным результатам, в среднем частота встречаемости сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором и с анеуплоидией по хромосомам 13, 18, 21, X и Y среди мужчин с нарушением репродуктивной функции и патозооспермией превосходит частоту встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией среди фертильных мужчин с нормозооспермией и нормальным мужским кариотипом 46,XY. В зависимости от сте-

пени нарушения сперматогенеза или формы патозооспермии частота встречаемости анеуплоидных гамет может превосходить референсные значения в 1,5–3 раза или более. Наши результаты согласуются с результатами большинства работ по исследованию хромосомного набора гамет с использованием мультицветной FISH у мужчин с бесплодием [27, 30]. Например, в работе Ch. Ushijima с соавторами представлены результаты по анализу частот встречаемости сперматозоидов с дисомией 13, 18, 21, XX, YY, XY у восьми мужчин с бесплодием и ОАТ I–II. В этой работе для каждого пациента на препарате анализировали не менее 5000 ПК [32]. В нашей работе и работе Ch. Ushijima с соавторами использованы ДНК-зонды одного производителя. Частоты вариантов дисомии в обследуемой и контрольной группах составили 0,13 и 0,09%, 0,12 и 0,13%, 0,24 и 0,19%, 0,16 и 0,12%, 0,21 и 0,12%, 0,23 и 0,14% соответственно. Средняя частота встречаемости сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором в группе мужчин с ОАТ I–II составила 0,29%, а в контрольной группе — 0,16%. В нашей работе в группе мужчин с ОАТ I–III приблизительно в 2 раза частоты встречаемости дисомии по хромосомам 13, 21 и XY дисомии превосходят значения, полученные Ch. Ushijima (табл. 2, 3). Мы полагаем, что это может быть связано с различиями в требованиях, предъявляемых к здоровью мужчин, участвующих в исследовании, или с принятыми в работе критериями цитогенетического анализа ПК.

Таблица 2

Средняя по группам частота встречаемости сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором и с анеуплоидией по хромосомам 13 и 21 (%) у мужчин с нормозооспермией, АТ и ОАТ I–III

	Хромосома 13		Хромосома 21		Диплоидные клетки
	Нуллисомия	Дисомия	Нуллисомия	Дисомия	
Группа контроля: нормозооспермия (11 пациентов)					
m±SE	0,13±0,03	0,11±0,04	0,22±0,07	0,20±0,08	0,40±0,18
R	0,09—0,21	0,07—0,21	0,09—0,33	0,1—0,38	0,17—0,72
Группа 1: олигоастенотератозооспермия различной тяжести (27 пациентов)					
m±SE	0,44±0,37	0,28±0,20*	0,70±0,74	0,59±0,50*	0,79±0,54
R	0,03—1,78	0—0,77	0,13—4,09	0,07—1,96	0,19—2,03
Тяжёлая форма олигоастенотератозооспермии (5 пациентов)					
m±SE	0,89±0,53	0,54±0,21*	1,42±1,53	1,38±0,66*	1,07±0,66*
R	0,41—1,78	0,21—0,77	0,14—4,09	0,38—1,96	0,45—1,94
Умеренная форма олигоастенотератозооспермии (14 пациентов)					
m±SE	0,41±0,24	0,28±0,15*	0,58±0,33	0,48±0,19*	0,80±0,55*
R	0,09—0,87	0,09—0,68	0,13—1,19	0,29—0,83	0,36—2,03
Лёгкая форма олигоастенотератозооспермии (8 пациентов)					
m±SE	0,20±0,17	0,11±0,08	0,45±0,18	0,30±0,22	0,39±0,18
R	0,03—0,57	0—0,25	0,23—0,67	0,07—0,77	0,19—0,64
Группа 2: астенотератозооспермия (29 пациентов)					
m±SE	0,27±0,18	0,16±0,10	0,37±0,29	0,32±0,25	0,57±0,65
R	0—0,77	0—0,48	0,12—1,59	0—1	0—3,18
Примечание. * — статистически значимые отличия (p<0,01); R — разброс значений					

Большинство исследователей придерживалось строгих критериев, разработанных В.В. Williams с соавторами [33]. Однако, несмотря на их соблюдение, при общей тенденции к увеличению доли ПК с хромосомным дисбалансом при патозооспермии наблюдался широкий разброс значений частот сперматозоидов с анеуплоидией у различных авторов как при АТ и ОАТ, так и при нормозооспермии [2]. В некоторых работах с использованием строгих критериев Williams при статистическом анализе результатов FISH получено свидетельство отсутствия связи между изменением уровня анеуплоидий в сперматозоидах и ухудшениями показателей СА [17].

Повышение в 2—3 раза частоты встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией наблюдали при изолированных и сочетанных формах тератозооспермии со специфическими мономорфными атипиями [18]. Высокий уровень анеуплоидных и/или полиплоидных гамет наблюдали при следующих патологических фенотипах сперматозоидов:

- в некоторых случаях при синдроме округлых головок, при глобулозооспермии [11, 19, 21];
- при большом количестве удлинённых головок сперматозоидов (в 30—100% зрелых ПК) среди эякулированных клеток сперматогенного ряда в сочетании с изолированной тератозооспермией у пациентов [7, 24];

- при большом количестве макроголовков (в 19—64% зрелых ПК), при сочетанной или изолированной тератозооспермии [6, 8, 14, 37].

Согласно проведённым нами наблюдениям, частота встречаемости сперматозоидов с вариантами анеуплоидии по хромосомам 13, 18, 21, X и Y выше в несколько раз у пациентов с тяжёлыми формами нарушения сперматогенеза при концентрации сперматозоидов ниже 10 млн/мл (ОАТ II—III).

Важно отметить, что у мужчин с ОАТ II—III частота встречаемости гамет с дисомией XY, дисомией по хромосоме 21 и частота встречаемости ПК с диплоидным хромосомным набором в среднем в 2 или 3 раза выше, чем среди здоровых мужчин (табл. 1, 2). Это подтверждает наличие предрасположенности к мейотическому нерасхождению хромосом 21, X- и Y-хромосом, а также указывает на то, что при ОАТ II—III высокая частота мейотического нерасхождения хромосом может быть обусловлена аномалиями внутритестикулярного микроокружения сперматогенных клеток, которые зачастую могут быть обнаружены при тяжёлых формах патозооспермии [22].

В ходе работы мы также отметили, что нередко у мужчин при ОАТ II—III высокий уровень анеуплоидии по половым хромосомам, хромосоме 21 и высокий уро-

Таблица 3

Средняя по группам частота встречаемости сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором и с анеуплоидией по хромосомам 18, X, Y (%) у мужчин с нормозооспермией, АТ и ОАТ I—III

	Хромосома 18		Половые хромосомы				Х-несущие ПК	Y-несущие ПК	Дипло- идные клетки
	Нулли- сомия	Дисомия	Нулли- сомия	Дисомия					
				XX	XY	YY			
Группа контроля: нормозооспермия (11 пациентов)									
m±SE	0,09±0,01	0,05±0,02	0,29±0,08	0,04±0,02	0,17±0,11	0,06±0,02	50,07±0,58	49,17±0,50	0,34±0,21
R	0,06—0,11	0,02—0,09	0,17—0,45	0—0,07	0,05—0,47	0,02—0,09	49,34—51,34	48,57—49,99	0,06—0,76
Группа 1: олигоастенотератозооспермия различной тяжести (27 пациентов)									
m±SE	0,27±0,28	0,13±0,10*	1,15±1,27	0,1±0,07*	0,64±0,63*	0,16±0,14	48,65±4,29	48,29±4,95	0,83±0,62*
R	0,03—1,33	0,04—0,41	0,18—6,96	0—0,33	0,04—3,07	0,03—0,52	42,02—64,70	35,18—56,63	0,14—2,79
Тяжёлая форма олигоастенотератозооспермии (5 пациентов)									
m±SE	0,48±0,54	0,18±0,14*	2,39±2,59	0,15±0,13*	1,20±1,12*	0,29±0,15*	50,19±8,29	44,10±8,12	0,86±0,62*
R	0,04—1,33	0,08—0,41	0,50—6,96	0—0,33	0,10—3,07	0,17—0,51	45,24—64,70	35,18—50,84	0,41—1,94
Умеренная форма олигоастенотератозооспермии (14 пациентов)									
m±SE	0,22±0,18	0,16±0,10*	1,02±0,60	0,12±0,04*	0,64±0,44*	0,14±0,09	49,05±2,76	47,84±3,06	1,05±0,67*
R	0,03—0,75	0,04—0,42	0,26—2,54	0,05—0,19	0,04—1,74	0—0,29	43,66—52,87	40,77—52,48	0,14—2,75
Лёгкая форма олигоастенотератозооспермии (8 пациентов)									
m±SE	0,15±0,08	0,07±0,06	0,60±0,28	0,04±0,05	0,30±0,23	0,11±0,17	46,99±3,13	51,68±3,15	0,42±0,23
R	0,03—0,25	0—0,20	0,18—0,94	0—0,16	0,09—0,85	0—0,52	42,02—51,06	46,93—56,63	0,19—0,80
Группа 2: астенотератозооспермия (29 пациентов)									
m±SE	0,22±0,17	0,11±0,09	0,50±0,22	0,07±0,06	0,31±0,25	0,09±0,08	48,77±2,46	49,55±2,52	0,64±0,80
R	0—0,70	0—0,40	0,21—1,11	0—0,21	0,04—1,05	0—0,30	43,24—52,56	46,51—55,57	0,09—3,28
Примечание. * — статистически значимые отличия (p<0,01); R — разброс значений									

вень сперматозоидов с диплоидным хромосомным набором находились в сочетании между собой.

Согласно нашим результатам, частота ХУ-дисомии при ОАТ III в среднем составляет $1,20 \pm 1,12\%$. У B.G. Younes с соавторами получены схожие результаты: среди мужчин с ОАТ I—III частота встречаемости дисомии по половым хромосомам варьирует от 0,90 до 12,87% [36]. Поэтому, по мнению специалистов, мужчин с тяжёлой формой ОАТ и/или мужчин-кандидатов на проведение процедур ЭКО/ИКСИ можно считать принадлежащими к группе риска по передаче потомству дополнительного хромосомного материала или сверхчисленных хромосом.

Частота встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией у мужчин с хромосомной патологией у потомства

Несмотря на общепризнанный факт, что в большинстве случаев трисомии по аутосомам (~90%) дополнительная хромосома имеет материнское происхождение, нельзя не признать наличие вклада анеуплоидии мужских гамет в структуру причин хромосомной патологии эмбриона/плода. Одна из наиболее часто встречающихся трисомий (1:600 новорождённых) — трисомия по хромосоме 21 (синдром Дауна) — в 5—10% случаев является результатом мейотического нерасхождения хромосом в гаметогенезе у мужчин [35]. Свидетельства наличия отцовского вклада в происхождение трисомии по хромосоме 21 получены в работе J. Blanco с соавторами [9]. У двух мужчин — отцов детей с синдромом Дауна — кариотип — 47,+21pat, частота встречаемости сперматозоидов с дисомией по хромосоме 21 составила 0,75% и 0,78%. В последнем случае повышенная частота дисомии по хромосоме 21 сопровождалась повышенной частотой дисомии по половым хромосомам — 0,69% и повышенной частотой встречаемости диплоидного хромосомного набора — 1,13%.

В нашей работе в ходе выполнения FISH-анализа частот встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией у мужчин с хромосомной патологией у потомства выявлено двое мужчин с повышенными частотами сперматозоидов с некоторыми вариантами ХА (табл. 1). У мужчины — с отметкой в анамнезе у супруги о беременности плодом с кариотипом 47,+21 — частота дисомии по хромосоме 21 составила 0,68%, тогда как частоты дисомии по 13, 18, X- и Y-хромосомам не превышали референсных значений. У пациента — отца ребёнка с синдромом Дауна — мы наблюдали повышенные частоты встречаемости сперматозоидов с дисомией по хромосоме 21 — 0,42%, с ХУ-дисомией — 0,58% и с диплоидным хромосомным набором — 3,19%.

Заключение

С развитием и внедрением в медицинскую практику методов ВРТ проблема зачатия и рождения здорового ребёнка становится решаемой для многих супружеских пар с бесплодием. Однако использование при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО) спермы мужчин с умеренной или тяжёлой формой олигозооспермии (ОАТ II—III) и при некоторых других формах нарушения спер-

матогенеза может быть сопряжено с генетическим риском, в том числе с риском рождения ребёнка с ХА [15]. Предположения о наличии высокого риска передачи потомству ХА при ЭКО и использовании спермы мужчин с большой долей сперматозоидов с хромосомным дисбалансом являются вполне обоснованными, поскольку при проведении процедур ВРТ естественного отбора сперматозоидов не происходит [13]. Более того, в научной литературе представлены сообщения, свидетельствующие о повышенной частоте встречаемости сперматозоидов с хромосомным набором 24,XY (1,39%) в сперме у мужчин в случаях рождения детей с анеуплоидией по половым хромосомам после проведения ЭКО/ИКСИ [20]. Высокая частота мейотического нерасхождения хромосом у мужчин с патозооспермией, по мнению некоторых специалистов, также негативно влияет на способность сперматозоидов к оплодотворению и на эффективность имплантации blastocysts [23, 26].

FISH-анализ частот встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией может быть рекомендован для мужчин с выраженной формой тератозооспермии, например с глобулозооспермией, и тяжёлыми формами олигозооспермии, а также для мужчин-кандидатов на проведение процедур ЭКО/ИКСИ как метод, позволяющий провести оценку вероятности формирования при оплодотворении *in vitro* зиготы со специфическим хромосомным дисбалансом [12]. Он может быть рекомендован также в случаях привычного невынашивания беременности у супруги при повторных неудачных попытках проведения ЭКО/ИКСИ [10].

Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1998. — 459 с.
2. Гордеева Е.Г., Шилейко Л.В., Панкратова О.С., Курило Л.Ф. Частота анеуплоидий в гаметах у фертильных мужчин // Генетика. — 2011. — Т. 47, №5. — С. 1—7.
3. Данилова Л.В. Полиморфизм сперматозоидов и атипичный сперматогенез // Сперматогенез и его регуляция / Данилова Л.В. (ред.), Габер Е.С., Данилова Л.В., Князева Е.Ф., Костомарова А.А., Наук В.А., Петросьян Ж.Л., Райцина С.С., Ротт Н.Н. (авт.). — М.: Наука, 1983. — С. 98—140.
4. Курило Л.Ф. Схема комплексного медико-генетического обследования пациентов с мужским бесплодием неясного генеза // Тез. докл. рос. научно-практ. конф. «Медико-генетическое консультирование в профилактике наследственных болезней», МЗ РФ, МНОМТ, МГНЦ РАМН, Москва, XI/1997. — С. 154—155.
5. Плохинский Н.А. (ред.) Биометрические методы. — М.: МГУ, 1975. — С. 90—91.
6. Achard V., Paulmyer-Lacroix O., Mercier G. et al. Reproductive failure in patients with various percentages of macronuclear spermatozoa: high level of aneuploid and polyploid spermatozoa // J. Androl. — 2007. — Vol. 28, №4. — P. 600—606.
7. Benzacken B., Gavelle F.M., Martin-Pont B. et al. Familial sperm polyploidy induced by genetic spermatogenesis failure: case report // Hum. Reprod. — 2001. — Vol. 16. — P. 2646—2651.
8. Bernardini L., Borini A., Preti S. et al. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men // Hum. Reprod. — 1998. — Vol. 13, №12. — P. 3406—3413.

9. Blanco J., Gabau E., Gomes D. et al. Chromosome 21 disomy in spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with a high prevalence of Down Syndrome: increased incidence in cases of paternal origin // *Am. J. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 63. — P. 1067–1072.
10. Calogero A.E., Burrello N., De Palma A. et al. Sperm aneuploidy in infertile men // *Reprod. Biomed. Online.* — 2003. — Vol. 6, №3. — P. 310–317.
11. Carrell D.T., Emery B.R., Liu L. Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection // *Fertil. Steril.* — 1999. — Vol. 71. — P. 511–516.
12. Carrell D. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises // *J. Androl.* — 2007. — P. 1–32.
13. Chandley A.C., Hargreave T.B. Genetic anomaly and ICSI // *Hum. Reprod.* — 1996. — Vol. 11. — P. 930–932.
14. Devillard F., Metzler-Guillemain C., Pelletier R. et al. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases // *Hum. Reprod.* — 2002. — Vol. 17. — P. 1292–1298.
15. Devroey P., Van Steirteghem A. A review of ten years experience of ICSI // *Hum. Reprod. Update.* — 2004. — Vol. 10. — P. 19–28.
16. Guttenbach M., Schakowski R., Schmid M. Incidence of chromosome 3, 7, 10, 11, 17 and X disomy in mature human sperm nuclei as determined by nonradioactive in situ hybridization // *Hum. Genet.* — 1994. — Vol. 1. — P. 7–12.
17. Guttenbach M., Martinez-Exposito M.-J., Michelmann H.W. et al. Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men // *Hum. Reprod.* — 1997. — Vol. 12, №3. — P. 468–473.
18. Machev N., Gosset P., Viville S. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia // *Cytogenet. Genome Res.* — 2005. — Vol. 111. — P. 352–357.
19. Martin R.H., Greene C., Rademaker A.W. Sperm chromosome aneuploidy analysis in a man with globozoospermia // *Fertil. Steril.* — 2003b. — Vol. 79. — P. 1662–1664.
20. Moosani N., Chernos J., Lowry R.B. et al. A 47,XXY fetus resulting from ICSI in a man with an elevated frequency of 24,XY spermatozoa // *Hum. Reprod.* — 1999. — Vol. 14, №4. — P. 1137–1138.
21. Morel F., Douet-Guilbert N., Moerman A. et al. Chromosome aneuploidy in the spermatozoa of two men with globozoospermia // *Mol. Hum. Reprod.* — 2004. — Vol. 10, №11. — P. 835–838.
22. Mroz K., Hassold T.J., Hunt P.A. Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors // *Hum. Reprod.* — 1998. — Vol. 14. — P. 1151–1156.
23. Nicopoullos J.D., Gilling-Smith C., Almeida P.A. et al. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? // *Hum. Reprod.* — 2008. — Vol. 23. — P. 240–250.
24. Prisant N., Escalier D., Soufir J.-C. et al. Ultrastructural nuclear defects and increased chromosome aneuploidies in spermatozoa with elongated heads // *Hum. Reprod.* — 2007. — Vol. 22, №4. — P. 1052–1059.
25. Rives N., Saint-Clair A., Mazurier S., Sibert L., Simeon N., Joly G., Mace B. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males // *Hum. Genet.* — 1999. — Vol. 105, №3. — P. 266–272.
26. Rubio C., Gil-Salom M., Simon C. et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome // *Hum. Reprod.* — 2001. — Vol. 16. — P. 2084–2092.
27. Sarrate Z., Vidal F., Blanco J. Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance // *Fertil. Steril.* — 2010. — Vol. 93, №6. — P. 1892–1902.
28. Soares S.R., Templado C., Blanco J. et al. Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin: generalized tendency to meiotic non-disjunction // *Hum. Genet.* — 2001a. — Vol. 108. — P. 134–139.
29. Spriggs E.L., Rademaker A.W., Martin R.H. Aneuploidy in human sperm: results of two- and three-color fluorescence in situ hybridization using centromeric probes for chromosomes, 1, 12, 15, 18, X and Y // *Cytogenet. Cell Genet.* — 1995. — Vol. 71. — P. 47–53.
30. Spriggs E.L., Rademaker A.W., Martin R.H. Aneuploidy in human sperm: the use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction // *Am. J. Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 58. — P. 356–362.
31. Templado C., Vidal F., Estop A. Aneuploidy in human spermatozoa // *Cytogenet. Genome Res.* — 2011. — Vol. 133. — P. 91–99.
32. Ushijima Ch., Kumasako Y., Kihale P.E. et al. Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization // *Hum. Reprod.* — 2000. — Vol. 15, №5. — P. 1107–1111.
33. Williams B.J., Ballenger C.A., Malter H.E. Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes // *Hum. Mol. Genet.* — 1993. — Vol. 2. — P. 1929–1936.
34. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. — Cambridge: Cambr. Univ. Press, 1999. — 143 p.
35. Yoon P.W., Freeman S.B., Sherman S.L. et al. Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of the chromosomal error: a population based study // *Am. J. Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 58. — P. 628–633.
36. Younes B.G., Hazzouri K.M., Chaaban M.J. et al. High frequency of sex chromosomal disomy in spermatozoa of Lebanese infertile men // *J. Androl.* — 2011. — Vol. 32, №5. — P. 518–523.
37. Yurov Y.B., Saias M.J., Vorsanova S.G. et al. Rapid chromosomal analysis of germ-line cells by FISH: an investigation of an infertile male with large-headed spermatozoa // *Mol. Hum. Reprod.* — 1996. — Vol. 2. — P. 665–668.

The frequency of aneuploidy in sperm of infertile men with pathozoospermia

Gordeeva E.G., Sorokina T.M., Shileiko L.V., Ostroumova T.V., Borzova O.S., Magomedova H.D., Kuzina N.Y., Barkova O.V., Kurilo L.F.

Research Center for Medical Genetics of Russian Academy of Medical Sciences (RAMS), Russian Federation, Moscow, 115478, Moskvorechie, 1; fax: +7(495)324-07-02; e-mail: gordeyevae@gmail.com

FISH-analysis of sperm aneuploidy for chromosomes 13, 18, 21, X and Y was carried out for men with asthenoteratozoospermia and for men with various severity of oligoasthenoteratozoospermia. Among the majority of examined men and their wives infertility or habitual noncarrying of pregnancy were directional diagnoses. It was shown that high frequency of meiotic non-disjunction of chromosomes is attended to mild and moderate oligoasthenoteratozoospermia among men with infertility. The mean frequencies of spermatozoa with disomy for chromosomes 13, 18, 21, and XX, XY, YY disomy among patients with OAT I-III were 0,28%, 0,13%, 0,59%, 0,1%, 0,64% and 0,16%, respectively.

Key words: chromosome non-disjunction, gamete aneuploidy, spermatogenic disturbances