

На правах рукописи

Киселева Юлия Юрьевна

**РОЛЬ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ ОТЦА
В ПРОГРАММАХ ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО
СКРИНИНГА ЭМБРИОНОВ**

03.02.07 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва

2017

Работа выполнена на кафедре биологии и общей генетики медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ и в ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент **Азова Мадина Мухамедовна**

Официальные оппоненты:

Брагина Елизавета Ефимовна

доктор биологических наук, старший научный сотрудник НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Калугина Алла Станиславовна

доктор медицинских наук, врач высшей категории, профессор кафедры акушерства, гинекологии и неонатологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2017 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.39 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; сайт: <http://dissovet.rudn.ru>)

Автореферат размещен на сайте <http://vak.ed.gov.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2017 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 212.203.39

кандидат биологических наук, доцент

Гигани Ольга Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В течение многих лет бесплодие остается актуальной медико-социальной проблемой. Известно, что с ней в течение репродуктивного периода сталкиваются от 8% до 15% супружеских пар (ВОЗ, 2010), то есть в мире насчитывается более 100 млн. супружеских пар, не способных к самостоятельному зачатию ребенка, причем более 40% из них не могут иметь детей по причине мужского бесплодия. Лишь у 70% мужчин удается установить причину бесплодия современными методами диагностики, а остальные 30% случаев приходится на так называемое идиопатическое бесплодие [Krausz C., Forti G., 2012]. По данным Российского центра акушерства, гинекологии и перинатологии более 4 млн. мужчин в РФ страдают бесплодием. Бесплодие в браке в других странах имеет сравнимые показатели [Сухих Г. Т. и др., 2008]. Следует отметить, что только 34% населения нашей страны знает о существовании мужского бесплодия, остальные убеждены, что оно бывает только женским [Троицкой И.А. и др., 2001].

Благодаря революционному развитию вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) программа экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в настоящее время является самым эффективным методом лечения бесплодия. Вместе с тем согласно опубликованным в 2013 г. данным Российской ассоциации репродукции человека (РАРЧ), в 2011 году только 36,6% пациенток забеременели после проведения процедуры ЭКО и 25,8% женщин, прошедших процедуру ЭКО, родили ребенка [РАРЧ, 2011].

Стремительное развитие ВРТ дало возможность иметь детей при формах бесплодия, которые ранее считались абсолютно бесперспективными для лечения [Кулаков В.И., Леонов Б.В., 2005], что, прежде всего, обусловлено достижениями молекулярной генетики и эмбриологии. Распространяются в клинической практике методики ИКСИ (от англ. *ICSI — Intra Cytoplasmic Sperm Injection*: введение сперматозоида в цитоплазму, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида), криоконсервация и предимплантационная генетическая диагностика эмбрионов, в частности, предимплантационный генетический скрининг эмбрионов (ПГС) на наличие анеуплоидий или других мутаций еще до переноса эмбриона, т.е. до наступления беременности [Harper J. C., SenGupta S. B., 2011].

Важнейшей задачей программы ВРТ является рождение здорового ребенка. Однако, большинство исследований свидетельствует о том, что частота хромосомных нарушений эмбрионов, полученных методом ВРТ, чрезвычайно высока. Многие ученые полагают, что именно наличие у эмбрионов хромосомных аномалий обуславливает низкую эффективность имплантации и частую потерю беременности, наблюдаемые при реализации ВРТ. В этой связи

необходимость диагностики возможных генетических нарушений сделала актуальным развитие молекулярно-генетических методов предимплантационного генетического анализа эмбрионов [Екимова Е. В. и др., 2012].

Технология сравнительной геномной гибридизации (СГГ) в последние годы стала активно применяться в медицине. За рубежом этот метод широко распространился в рутинной практике лабораторий ВРТ и получил название CGH (comparative genome hybridization). Ряд исследований показал, что эффективность выявления анеуплоидий с помощью метода сравнительной геномной гибридизации по сравнению с методом FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*) выше на 20-25%. Более того, кроме численных аномалий с помощью СГГ выявляются и другие хромосомные нарушения, не обнаруживаемые при использовании FISH, такие как многие делеции и амплификации участков хромосом. Показано, что применение данного метода повышает результативность программы ВРТ [Traversa M.V.et al., 2011].

Существуют многочисленные исследования, посвященные сравнению генетических характеристик и морфологии эмбрионов, в которых авторы статей независимо друг от друга приходят к выводу, что значительные хромосомные нарушения в геноме эмбриона зачастую не отражаются на морфологии эмбрионов столь ранних стадий развития, так как большинство генов, содержащихся в аномальных хромосомах, еще не проявили себя в доимплантационных эмбрионах [Chow J.F. et al., 2014].

Также много исследований посвящено схемам гормональной стимуляции у женщин, участвующих в цикле ВРТ с ПГС. Их результаты показывают существенное влияние состояния ооцитов на результаты ПГС полученных эмбрионов. Важнейшими факторами являются возраст женщины, вступившей в программу ВРТ, ее гинекологический и соматический анамнез [Zech N.H.et al., 2015]. Принимая во внимание существенный вклад материнского генома в генетические характеристики будущего эмбриона, исследователи предлагают перед проведением оплодотворения методом ИКСИ анализировать полярные тельца яйцеклеток и выбирать только яйцеклетки, несущие «правильный» набор хромосом [Scriven P.N. et al., 2012]. Вместе с тем большое количество данных по отцу не учитывается, хотя нельзя забывать, что генетический материал полученного эмбриона в равной степени состоит из генов отца и матери, и успех вынашивания и рождения здорового ребенка зависит от функционирования обоих геномов. Имеются данные о влиянии той или иной патологии сперматозоидов на эффективность зачатия и последующее вынашивание плода [Jungwirth A. et al., 2012]. Обращают на себя внимание работы, свидетельствующие о наличии генетической основы различных патологических состояний сперматозоидов, в частности, таких как азооспермия и

олигоастенотератоспермия (изменение концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов) [Брагина Е.Е. и соавт., 2015; Damyanova V. et al., 2012].

В мировой практике приобретает популярность и все чаще используется в диагностике мужского бесплодия анализ фрагментации ДНК ядра сперматозоида. Ряд исследователей придерживается мнения о значимой роли фрагментации ДНК ядра в ранней потере беременности как при естественном зачатии, так и после ЭКО [Robinson L. et al., 2012]. Есть данные о замедлении темпов развития ранних эмбрионов у пар с такой патологией [Wdowiak A. et al., 2015]. Также известно об увеличении числа хромосомных аномалий в сперматозоидах пациентов с повышенным уровнем фрагментации ядра [Enciso M. et al., 2013].

Совсем недавно начали появляться первые публикации о влиянии геномных нарушений в сперме на генетический материал 3-дневных эмбрионов [Kaarouch I. et al., 2015].

Таким образом, исследования, посвященные изучению и сравнительному анализу функциональных показателей отцовских сперматозоидов и результатов предимплантационного генетического скрининга эмбрионов, актуальны и представляют значительный научный и практический интерес.

Цель работы. Исследовать влияние функциональных показателей сперматозоидов отца на результаты предимплантационного генетического скрининга эмбрионов, выполненного методом сравнительной геномной гибридизации на чипах.

Задачи исследования

1. Оценить концентрацию, подвижность и морфологию сперматозоидов отца в парах, прошедших программу ИКСИ с ПГС эмбрионов.
2. Оценить уровень фрагментации ДНК ядра сперматозоидов методом TUNEL.
3. Проанализировать результаты полногеномного скрининга эмбрионов методом СГГ на чипах.
4. Исследовать возможность наличия ассоциации нарушений кариотипа эмбрионов с функциональными показателями сперматозоидов отца.

Научная новизна работы. Анализ научной литературы показал, что подобные комплексные исследования, включающие в себя сравнение характеристик сперматозоидов отца с результатами полногеномного скрининга эмбрионов, ранее не проводились. Представленная работа весьма актуальна для отечественной науки, так как протоколы лечения бесплодных пар в настоящее время дополняются и пересматриваются.

Анализ фрагментации ДНК ядра сперматозоидов – относительно новый метод в рутинной практике обследования пациентов в программах вспомогательных репродуктивных технологий, в связи с чем влияние данного параметра на генетический материал эмбриона

требует тщательного изучения. В рамках настоящего исследования установлено, что уровень фрагментации ДНК выше 15% ассоциирован с делециями и дупликациями в хромосомах эмбрионов, а также сопровождается увеличением вероятности рождения ребенка с синдромом Шерешевского-Тернера.

Теоретическая и практическая значимость. Рождение здорового ребенка в семье – важная социальная и экономическая задача государства, поэтому поиск возможностей для решения данной задачи относится к числу приоритетных направлений науки и медицины.

Настоящее исследование расширяет имеющиеся представления о влиянии функциональных показателей сперматозоидов отца на генетический материал эмбриона.

Результаты, полученные в рамках представленной работы, будут способствовать оптимизации схемы лабораторного обследования мужчин и выбору дополнительных показаний для прохождения программ предимплантационного генетического скрининга.

Методология и методы диссертационного исследования. Определение концентрации, подвижности и морфологических характеристик сперматозоидов проводилось с использованием автоматического спермоанализатора ВидеоТест 2.1 (Россия). Уровень фрагментации ДНК сперматозоидов устанавливался методом TUNEL. Для всех пар было проведено экстракорпоральное оплодотворение методом ИКСИ с последующей биопсией эмбрионов. Биопсированный генетический материал был подвергнут предимплантационному генетическому скринингу с помощью сравнительной геномной гибридизации на чипах. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программ «Statistica 6.0» и «R language» (R Core Team, 2015).

Положения, выносимые на защиту

1. Функциональные показатели сперматозоидов отца оказывают значимое влияние на результаты предимплантационного генетического скрининга эмбрионов, полученных методом ИКСИ.

2. Уменьшение содержания морфологически нормальных сперматозоидов до уровня ниже 4% приводит к увеличению частоты эмбрионов с численными аномалиями хромосом, а также делециями и дупликациями. Снижение концентрации сперматозоидов (менее 15 млн/мл) сопровождается повышением встречаемости эмбрионов с кариотипом 45, X0. Вместе с тем подвижность сперматозоидов не влияет на результаты ПГС при проведении оплодотворения методом ИКСИ.

3. Уровень фрагментации ДНК выше 15% ассоциирован с делециями и дупликациями в хромосомах эмбрионов, а также с увеличением частоты кариотипа 45, X0.

4. Проведение предимплантационного генетического скрининга эмбрионов при выявлении у мужчин патологии сперматозоидов позволит снизить как риск рождения ребенка с заболеваниями, обусловленными изменением числа и структуры хромосом, так и вероятность невынашивания беременности и самопроизвольного абортирования плода, связанных с наличием аномалий в кариотипе эмбриона.

Степень достоверности. Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным объемом фактического материала (147 пар, 761 исследованный эмбрион), применением современных технологий и использованием методов статистической обработки данных, полностью соответствующих поставленным задачам.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертации доложены на XXIII международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (г. Волгоград, 2013 г.), 32 Европейской конференции общества репродуктологов и эмбриологов (The 32th ESHRE, Финляндия, 2016 г.) и заседании кафедры биологии и общей генетики медицинского института РУДН (2017 г.).

Внедрение результатов в практику. Рекомендации для первичного обследования эякулята мужчин на дополнительные параметры внедрены в практику ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения России. Анализ фрагментации ДНК ядра сперматозоидов добавлен в рекомендуемый список обследований перед вступлением пары в программу ЭКО/ИКСИ в Отделении Репродукции ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения России.

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 6 научных работ, из них 4 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 110 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения и списка литературы. Работа иллюстрирована 11 таблицами и 8 рисунками. Библиография включает 181 источник российской и зарубежной литературы.

Личный вклад автора. Автором лично выполнялись манипуляции по получению яйцеклеток и проведению оплодотворения методом ИКСИ; биопсия трофобласта эмбрионов; анализ спермограммы и уровня фрагментации ДНК ядра сперматозоидов; анализ

полученных из медицинской документации анамнестических, клинических и лабораторных данных пациентов; статистическая обработка и обобщение результатов исследования.

Материал исследования. В исследование были включены 147 пар, прошедших программу ИКСИ+ПГС и у которых было исследовано более 1 эмбриона.

В рамках настоящей работы рассматривались 2 группы:

1. Общая группа исследуемых (средний возраст женщин составил $34,4 \pm 6,6$ года, мужчин - $37,9 \pm 12,1$ года), включавшая 147 пар.
2. Группа репродуктивного возраста (средний возраст женщин составил $31,6 \pm 3,8$ года, мужчин - $35,5 \pm 4,5$ года), включавшая 93 пары.

Каждая пара прошла полное обследование в соответствии с Приказом МЗ РФ №107н от 30 августа 2012 г. «*О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению*». Проведение исследования было одобрено этическим комитетом Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В программе ЭКО была проведена стандартная стимуляция. Со 2-го дня менструального цикла и до дня введения триггера овуляции пациенткам вводили индивидуально подобранную дозу рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (пурегон/гонал) от 112,5 МЕ до 200 МЕ в сутки. В процессе стимуляции дозу корректировали в зависимости от ответа яичников. При достижении фолликулами диаметра 14 мм для предотвращения преждевременного пика содержания лютеинизирующего гормона пациенткам вводился антагонист гонадотропин-рилизинг-гормона (цетрореликс 0,25 мг). Триггер овуляции вводили при наличии в яичниках ≥ 3 фолликулов диаметром ≥ 17 мм. Трансвагинальная пункция яичников (ТВП) выполнялась через 35-36 часов после введения триггера овуляции.

Методы исследования

Стандартные методы исследования. Полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с Приказом МЗ РФ №107н от 30 августа 2012 г. «*О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению*».

Определение концентрации, подвижности и морфологических характеристик сперматозоидов проводилось с использованием автоматического спермоанализатора ВиодеоТест 2.1 (Россия). В качестве нормы рассматривались следующие параметры: концентрация – более 15 млн/мл, доля активно подвижных сперматозоидов – более 32%, доля сперматозоидов с нормальной морфологией – более 4%.

Определение уровня фрагментации ДНК ядра сперматозоида осуществлялось флуоресцентным методом TUNEL с использованием набора реагентов AporTag *In Situ* Apoptosis Detection Kits (Millipore, Бельгия).

Экстракорпоральное оплодотворение выполнялось с помощью метода интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ).

Культивирование эмбрионов до 5-х суток развития. Биопсия эмбрионов исследуемой пары осуществлялась методами микроскопической и манипуляционной микротехники.

Метод сравнительной геномной гибридизации на чипах (СГГ) применялся для предимплантационного генетического скрининга эмбрионов. Исследование выполнялось с использованием оборудования фирмы Agilent (США). Полногеномную амплификацию ДНК исследуемых клеток проводили с помощью набора PicoPlex SingleCell WGA Kit (Rubicon Genomics, США). Мечение ампликонов осуществлялось с использованием набора SureTag DNA labeling Kit Agilent (США) согласно прилагаемой инструкции. Меченые ампликоны наносили на биочип Sure Print G3 8x60 KCGH Agilent (США), гибридизировали 16 часов, после чего проводили отмывку и сканирование на сканере биологических чипов Sure ScanMicroarrayScanner. Интерпретацию полученных результатов осуществляли с помощью программного продукта Agilent CytoGenomics 2.5.8.1. В работе рассматривались только пары с количеством диагностированных эмбрионов более 1.

Статистическая обработка результатов исследования. Для сравнения средних в группах применяли модификацию t-теста Стьюдента для наблюдений с весами [Goldberg L. et al., 2005], реализованную в пакете «*R language*» [R Core Team, 2016]. В качестве весов использовали число биопсированных эмбрионов. Для подтверждения полученных результатов также применяли непараметрический критерий Манна-Уитни-Уилкоксона, рассчитанный с помощью программы *Statistica 6.0*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Концентрация сперматозоидов

При изучении ассоциации концентрации сперматозоидов с кариотипом получаемых эмбрионов рассматривались 2 подгруппы: у мужчин одной подгруппы содержание сперматозоидов было более 15 млн в одном миллилитре эякулята, что по современным критериям ВОЗ рассматривается в качестве нормы, а у мужчин другой подгруппы – менее 15 млн/мл (патология). Результаты, полученные в общей группе исследуемых, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Частота (%) аномалий числа и структуры хромосом у эмбрионов в парах с нормальной и патологической концентрацией сперматозоидов (общая группа исследуемых пар)

Кариотип эмбрионов	Концентрация сперматозоидов в эякуляте		p t-тест	p МУУ-тест
	Менее 15 млн/мл (n=41)	Более 15 млн/мл (n=92)		
Нормальный	47.31	47.77	0.9449	0.6911
Трисомии по аутосомам	32.71	33.82	0.8445	0.7908
Моносомии по аутосомам	32.14	33.69	0.7887	0.6087
Трисомии по половым хромосомам	3.27	5.11	0.3329	0.6483
Делеции и амплификации	16.35	11.95	0.3708	0.6587

Как видно из представленных данных, в сравниваемых подгруппах нормальный кариотип наблюдается приблизительно у 47% эмбрионов. Встречаемость численных аномалий аутосом, трисомий по половым хромосомам так же, как делеций и амплификаций, в данных подгруппах достоверно не отличается.

Аналогичные результаты были получены в группе репродуктивного возраста (табл. 2). Вместе с тем в группе репродуктивного возраста наблюдается выраженная тенденция к увеличению частоты эмбрионов с нормальным кариотипом, что особенно заметно в подгруппе с нормальной концентрацией сперматозоидов. При этом снижается встречаемость численных аномалий аутосом.

Выделение группы пациентов репродуктивного возраста обусловлено стремлением минимизировать материнский эффект, так как в литературе можно найти множество работ, в которых связывают частоту анеуплоидий в эмбрионах и возраст матери [Verlinsky Y. et al., 1997; Marquez C. et al., 2000; Kuliev A. et al., 2005; Munné S. et al., 2005; Gianaroli L. et al., 2010; Nagaoka S.I. et al., 2012].

Таблица 2. Частота (%) аномалий числа и структуры хромосом у эмбрионов в парах с нормальной и патологической концентрацией сперматозоидов (группа репродуктивного возраста)

Кариотип эмбрионов	Концентрация сперматозоидов в эякуляте		p t-тест	p МУУ-тест
	Менее 15 млн/мл (n=30)	Более 15 млн/мл (n=63)		
Нормальный	53.47	57.81	0.617	0.8292
Трисомии по аутосомам	27.85	24.36	0.6172	0.5578
Моносомии по аутосомам	23.86	26.74	0.6379	0.5596
Трисомии по половым хромосомам	3.74	4.61	0.7437	0.9385
Делеции и амплификации	19.17	13.58	0.3859	0.5913

Особо следует отметить, что статистический анализ результатов предимплантационного генетического скрининга эмбрионов все-таки выявил достоверные отличия между группами пар с олигозооспермией и нормозооспермией. Так, при снижении концентрации сперматозоидов ниже нормы ВОЗ наблюдалось значимое повышение встречаемости эмбрионов с кариотипом 45, XO, фенотипически соответствующим синдрому Шерешевского-Тернера как в общей группе исследуемых, так и в группе репродуктивного возраста, причем во втором случае отличия более выражены (табл. 3).

Таблица 3. Встречаемость синдрома Шерешевского-Тернера у эмбрионов исследованных пар

Общая группа исследуемых пар			
Концентрация сперматозоидов	менее 15 млн/мл	более 15 млн/мл	
Встречаемость синдрома Шерешевского-Тернера, %	1,37	0,79	p t-тест 0,0515
Группа репродуктивного возраста			
Концентрация сперматозоидов	менее 15 млн/мл	более 15 млн/мл	
Встречаемость синдрома Шерешевского-Тернера, %	1,59	0	p t-тест 0,0193

Согласно литературным данным, в парах с мужским фактором бесплодия наблюдается повышенное количество получаемых анеуплоидных эмбрионов, причем имеется корреляция между количеством хромосомных аномалий в сперме и эмбрионах от данного мужчины [Magli C. et al., 2009, Rodrigo L. et al., 2010]. Полученные нами данные согласуются с результатами Tang et al. (2004) и Kaarouch I. et al., (2015), выявившими повышение частоты нулисомий по половым хромосомам в эмбрионах в парах с мужским фактором бесплодия. Вышеуказанные факты можно объяснить тем, что олигозооспермия зачастую является следствием глубоких генетических нарушений сперматогенеза [Poongothai J. et al., 2009].

2. Подвижность сперматозоидов

Подвижность сперматозоидов является ключевым фактором, влияющим на доставку отцовского генетического материала к яйцеклетке. Перемещение сперматозоида представляет собой достаточно сложный процесс, в котором задействовано множество белков, и, соответственно, мутация в любом из генов данных белков может привести к нарушению подвижности. Встречается также и сочетанное нарушение ультраструктуры ряда компонентов сперматозоидов. Даже у фертильных мужчин сперматозоиды обычно гетерогенны: наряду с нормальными клетками в эякуляте обнаруживаются разнообразные формы с патологией акросомы, укладки хроматина, с различными аномалиями ультраструктуры жгутика. Показано, что повышенное количество сперматозоидов с измененным положением акросомы у пациентов с астенозооспермией и нарушениями структуры жгутика обнаруживают в 1,5 раза чаще, чем у пациентов с нормальной подвижностью клеток [Хаят С.Ш., Брагина Е.Е., Курило Л.Ф., 2012].

В рамках представленной работы изучалась взаимосвязь подвижности сперматозоидов с результатами ПГС эмбрионов. Пары были разделены на 2 подгруппы: с долей сперматозоидов категорий подвижности А и В в сумме не меньше 32% (норма по критериям ВОЗ) и с долей сперматозоидов категорий подвижности А и В в сумме меньше 32% (патология). Полученные данные приведены в таблицах 4 и 5.

В ходе проведенного нами исследования было обнаружено, что подвижность сперматозоидов не ассоциирована с нарушениями в хромосомном наборе эмбрионов как в общей группе исследуемых, так и в группе репродуктивного возраста. Диагноз астенозооспермия сам по себе не связан с уменьшением числа эмбрионов с нормальным набором хромосом и увеличением уровня анеуплоидий. Это можно объяснить техникой оплодотворения методом ИКСИ, при которой выбор сперматозоида с помощью микроманипулятора нивелирует влияние ослабленной подвижности сперматозоидов, так как сперматозоид не совершает «длинный путь» через половые пути к яйцеклетке.

Таблица 4. Частота (%) аномалий числа и структуры хромосом при нормальной и патологической подвижности сперматозоидов (общая группа исследуемых пар)

Кариотип эмбриона	Подвижность сперматозоидов в эякуляте		p t-тест	p МУУ-тест
	Менее 32% (n=45)	Более 32% (n=102)		
Нормальный	42,97	49,68	0,2648	0,5664
Трисомии по аутосомам	39,15	31,3	0,1871	0,4009
Моносомии по аутосомам	35,17	32,68	0,6293	0,7496
Трисомии по половым хромосомам	4,67	4,84	0,935	0,8677
Моносомии по половым хромосомам	1,61	1,12	0,6546	0,36
Делеции и амплификации	13,55	12,37	0,755	0,8803

Таблица 5. Частота (%) аномалий числа и структуры хромосом при нормальной и патологической подвижности сперматозоидов (группа репродуктивного возраста)

Кариотип эмбриона	Подвижность сперматозоидов в эякуляте		p t-тест	p МУУ-тест
	Менее 32% (n=29)	Более 32% (n=64)		
Нормальный	57,82	56,73	0,8824	0,7828
Трисомии по аутосомам	23,86	25,42	0,8186	0,4688
Моносомии по аутосомам	24,67	26,79	0,6939	0,5126
Трисомии по половым хромосомам	3,31	4,87	0,5234	0,8244
Моносомии по половым хромосомам	2,0	1,04	0,5369	0,2623
Делеции и амплификации	16,59	13,86	0,6002	0,9058

Значительный интерес представляют недавние исследования, продемонстрировавшие ассоциацию снижения подвижности сперматозоидов с наличием ряда бактерий, таких как условно-патогенная *Ureaplasma spp.* Инфекция оказывает влияние на продукцию АТФ в жгутике сперматозоида, в связи с чем сниженная подвижность сперматозоидов отца в эякуляте не влияет на хромосомный набор эмбрионов [Zhou Y.H. et al., 2017]. Аналогичный эффект могут оказывать и другие бактерии (стафилококки, эшерихии, стрептококки и энтерококки) [Zeyad A. et al., 2017].

3. Морфология сперматозоидов

ВОЗ постепенно снижает показатели «нормы» для анализов сперматозоидов. Так, если в 2002 г. норма концентрации сперматозоидов в миллилитре эякулята составляла 20 млн, то в 2010 г. нормой уже признается 15 млн сперматозоидов. Показатель «нормы» для морфологии сперматозоидов также снизился с 14% до 4%. Во всем мире принято определять эталон правильной морфологии по Крюгеру. В 1986 г. Т. Крюгер и Р. Менквельт предложили строгие критерии, основанные на морфологии посткоитальных сперматозоидов. Они изучали только те сперматозоиды, которые смогли пройти через нити цервикальной слизи. Было выдвинуто предположение, что эти «идеальные» сперматозоиды являются более фертильными, чем имеющие морфологические дефекты [Нерсеян Р.А., 2001]. Идея использовать указанный тип сперматозоидов в качестве эталона для сравнения лежит в основе концепции строгих критериев, что поддерживается результатами изучения морфологических характеристик сперматозоидов, связанных с блестящей оболочкой яйцеклетки [Liu D.Y., Baker H.W.G., 1992]. Литературные данные свидетельствуют, что исследование морфологии сперматозоидов, выполненное согласно строгим критериям, способно предсказывать исходы оплодотворения *in vitro* и частоту наступления беременности с большей точностью, чем другие традиционные параметры эякулята, а также другие методы оценки морфологии. При содержании морфологически нормальных сперматозоидов в эякуляте менее 4% частота оплодотворения достоверно снижается [Coetzee K. et al., 1998]. Можно предположить, что изменения в морфологии сперматозоидов препятствуют правильному слиянию цитоплазмы яйцеклетки и сперматозоида, либо к рецепторной дисфункции. Но если бы все причины мужского бесплодия сводились только к подобным дефектам, они легко преодолевались бы оплодотворением методом ИКСИ. Однако, несмотря на использование данного метода оплодотворения, получение жизнеспособного эмбриона и наступление беременности затруднено в парах со сниженной долей морфологически нормальных сперматозоидов. Возможно, причиной являются нарушения в организации хромосомного материала в морфологически «неправильном»

сперматозоиде, что может препятствовать слиянию сперматозоида и яйцеклетки, а также отрицательно влиять на развитие эмбриона. В литературе существуют указания на корреляцию между нарушениями в организации ядер у морфологически аномальных сперматозоидов и их способностью к оплодотворению [Kruger T.F. et al., 1986, Liu Y., Baker H.W.G., 1992]. Причины, ведущие к нарушениям в упаковке хроматина спермиев, сегодня не совсем ясны. Вероятно, это не наследственные изменения, а нарушения сперматогенеза в результате каких-либо патологических процессов или неблагоприятных воздействий среды [Никитин А.И., 1988; Sakkas D. et al., 1996].

Статистическая обработка полученных нами результатов предимплантационного генетического скрининга эмбрионов выявила достоверные отличия в группах с нормальной и низкой долей морфологически нормальных сперматозоидов в общей группе исследуемых (табл. 6).

Таблица 6. Частота (%) аномалий числа и структуры хромосом в подгруппах с нормальной и низкой долей морфологически нормальных сперматозоидов (общая группа исследуемых пар)

Кариотип эмбриона	Доля морфологически нормальных сперматозоидов		p МУУ- тест
	Менее 4% (66 пар)	Более 4% (81 пара)	
Нормальный	27,83	58,41	0,0003
Трисомии по аутосомам	48,57	25,55	0,0001
Моносомии по аутосомам	46,29	26,47	0,0004
Моносомии по половым хромосомам	1,17	1,32	0,4850
Делеции и дубликации	16,03	6,57	0,0260

Была обнаружена зависимость между долей морфологически нормальных сперматозоидов отца и кариотипом полученных эмбрионов. Установлено, что частота нормального набора хромосом составляет 58,41% при содержании сперматозоидов с нормальной морфологией более 4% против 27,83% при низкой доле морфологически нормальных сперматозоидов ($p < 0.001$). Также наблюдается статистически значимое повышение частоты численных аномалий аутосом в группах с пониженной долей морфологически нормальных сперматозоидов. Ранее хромосомные аномалии приписывали, прежде всего, нарушениям в яйцеклетке, ассоциированным с возрастом

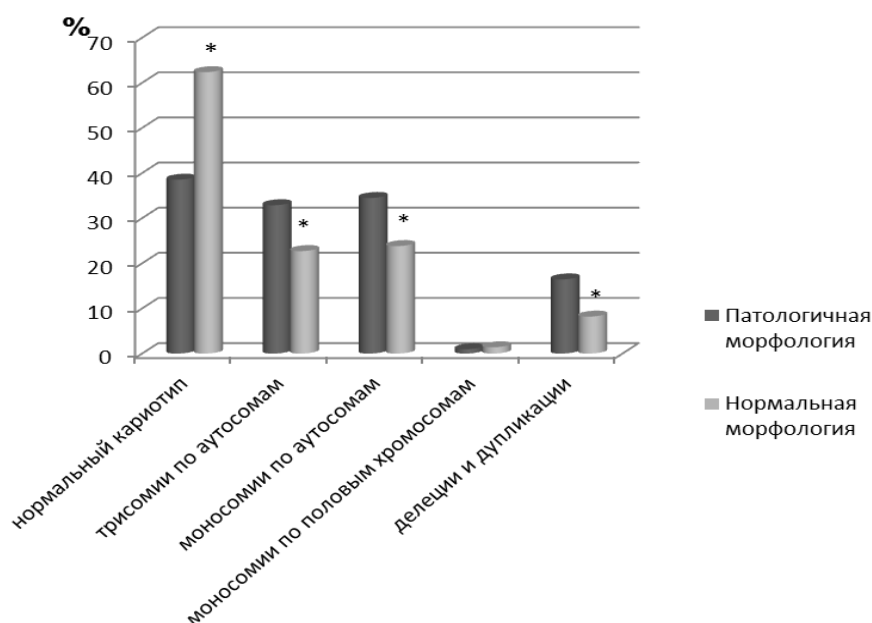
женщины [Баранов В. С., Кузнецова Т. В., 2007]. Но к настоящему времени многие авторы также отмечают значительную роль сперматозоидов в возникновении анеуплоидий эмбриона [McKinlay, Gardner R. J., 2012; Aran B. et al., 2014].

Вместе с тем в рамках данной работы было обнаружено существенное увеличение частоты делеций и дупликаций у эмбрионов в парах с низким содержанием морфологически нормальных сперматозоидов (16,03% против 6,57% в норме), что позволяет предполагать, что повреждения в структуре ДНК сперматозоидов внесли свой вклад в генетический материал эмбриона. Также, согласно ряду исследований, повреждение ДНК сперматозоидов оказывает отрицательное влияние на оплодотворение и частоту имплантации эмбрионов и играет сопричастную роль в наступлении спонтанных аборт в ситуациях естественного наступления беременности [Benkhalifa M. et al., 2014].

Морфология сперматозоидов зачастую ассоциирована с возрастом пациентов, поэтому данный параметр рассматривался как в общей группе пациентов, так и в группе пациентов репродуктивного возраста (рис.1).

Как видно из представленной гистограммы, результаты, полученные в группе репродуктивного возраста, сходны с таковыми в общей группе исследуемых. Эти данные согласуются с работами Çankaya et al. (2011), показавшими, что отцовский вклад в формирование полисомий у эмбриона выше в парах с мужским фактором бесплодия [Çankaya T. et al., 2011].

Рис 1. Частота (%) аномалий числа и структуры хромосом в подгруппах с нормальной и низкой долей морфологически нормальных сперматозоидов (группа репродуктивного возраста)



Также многие авторы отмечают, что наличие аномальных сперматозоидов с дисомией по половым хромосомам – распространенное явление у мужчин со сниженным содержанием морфологически нормальных сперматозоидов, что в итоге приводит к появлению эмбрионов с трисомией по половым хромосомам [Kaarouch I. et al., 2015]. В связи с вышесказанным, отдельно хотелось бы остановиться на синдроме Клайнфельтера, который был описан в 1942 г. Г. Клайнфельтером и Ф. Олбрайтом, и является одной из наиболее распространенных генетических причин мужского бесплодия и первичной тестикулярной недостаточности. Он характеризуется разнообразием цитогенетических вариантов и их мозаичных сочетаний [Мельниченко Г. А. и др., 2007].

Изменение числа хромосом, приводящее к синдрому Клайнфельтера, обусловлено их нерасхождением при мейозе или при митотическом делении на ранней стадии развития эмбриона [Linden M. et al., 1995]. Согласно литературным данным, до 60% мейотических нарушений приходится на материнские гаметы и ассоциировано с возрастом. Но также есть исследования, показавшие, что сперматозоиды мужчин с олигоастенозооспермией несут в 100 раз больше дисомий по половым хромосомам по сравнению с образцами, характеризующимися нормозооспермией [Kirkpatrick G. et al., 2008].

Полученные нами результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7. Встречаемость синдрома Клайнфельтера у эмбрионов исследованных пар

Общая группа исследуемых пар			
Доля сперматозоидов с нормальной морфологией	менее 4%	4% или более	
Встречаемость синдрома Клайнфельтера, %	7,2	3,49	p t-тест 0,0436
Группа репродуктивного возраста			
Доля сперматозоидов с нормальной морфологией	менее 4%	4% или более	
Встречаемость синдрома Клайнфельтера, %	10,82	2,61	p t-тест 0,0228

Как видно из представленной таблицы, встречаемость синдрома Клайнфельтера у эмбрионов значительно повышается при уменьшении содержания в эякуляте сперматозоидов с нормальной морфологией. Согласно данным Gianaroli L. et al. (2005) дисомии по половым хромосомам являются наиболее часто встречающимися анеуплоидиями в сперме бесплодных мужчин. Kirkpatrick et al. (2008) показали 100-кратное большее количество XY дисомий в случаях олигоастенозооспермии по сравнению с нормозооспермией. Также следует

отметить, что по литературным данным, отцовский вклад значим не только для возникновения анеуплоидий, но и полиплоидий в связи с высокой частотой диплоидности сперматозоидов бесплодных пациентов [Benkhalifa M. et al., 1993; Munné S. et al., 1998; Pang M.G. et al., 1999; Ushijima C. et al., 2000; Shi Q. et al., 2001; Kahraman S. et al., 2006; Çankaya T. et al., 2011; Zhu Y. et al., 2013].

В отличие от многих других анеуплоидий, синдром Клайнфельтера не ассоциирован с повышенным риском выкидыша и не является летальным фактором [Nieschlag E. et al., 2014]. На данный момент возможно использование методики предимплантационного генетического скрининга (ПГС) для выбора эмбрионов с нормальным набором хромосом. Если у мужчины выявляются отклонения в морфологии сперматозоидов, целесообразно использовать программу ПГС для снижения риска рождения ребенка с синдромом Клайнфельтера и трисомиями по аутосомам.

Таким образом, для оплодотворения необходим строгий отбор сперматозоидов по морфологическим показателям. Данная технология, получившая название ИМСИ (усовершенствованная технология ИКСИ, основанная на микроинъекции тщательно отобранного морфологически нормального сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки), уже применяется в мировой клинической практике. Согласно литературным данным, использование метода ИМСИ снижает частоту анеуплоидий по половым хромосомам и уменьшает риск получения эмбрионов с хаотичным набором хромосом [Setti A.S. et al., 2014].

4. Фрагментация ДНК ядра сперматозоидов

В последние годы значительный интерес вызывает исследование фрагментации ядерной ДНК сперматозоидов при мужском факторе бесплодия. Уровень фрагментации ДНК определяется методом TUNEL. Установлено, что пациенты, у которых обнаруживают более 15% TUNEL-позитивных сперматозоидов, имеют сниженную результативность ЭКО, и уровень выше 15% признается патологичным [Руднева С.А. и соавт., 2014].

Полученные нами при исследовании фрагментации ДНК сперматозоидов данные представлены в таблицах 8 и 9.

Таблица 8. Частота аномалий числа и структуры хромосом в подгруппах с нормальным и высоким уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов (общая группа исследуемых пар)

Кариотип эмбриона	Уровень фрагментации ДНК сперматозоидов		p МУУ-тест
	Менее 15% (n=112)	Более 15% (n=58)	
Нормальный	66.17	47.96	0.0275
Трисомии по аутосомам	18.95	29.11	0.2736
Моносомии по аутосомам	16.72	29.51	0.113
Трисомии по половым хромосомам	4.6	8.54	0.3134
Моносомии по половым хромосомам (45, X0)	1.22	4.95	0.0313
Делеции и дупликации	5.39	35.89	0.0116

Таблица 9. Частота аномалий числа и структуры хромосом в подгруппах с нормальным и высоким уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов (группа репродуктивного возраста)

Кариотип эмбриона	Уровень фрагментации ДНК сперматозоидов		p МУУ-тест
	Менее 15% (n=71)	Более 15% (n=22)	
Нормальный	58.39	45.02	0.0896
Трисомии по аутосомам	23.77	30.84	0.2407
Моносомии по аутосомам	24.63	30.34	0.5328
Трисомии по половым хромосомам	5.69	9.26	0.4623
Моносомии по половым хромосомам (45, X0)	0.93	3.5	0.0261
Делеции и дупликаций	5.03	38.66	0.0412

Статистическая обработка результатов предимплантационного генетического скрининга эмбрионов выявила достоверное отличие подгрупп с повышенным уровнем фрагментации ДНК

ядра сперматозоидов (более 15%) от подгрупп с нормальными значениями данного показателя. Так, установлено, что встречаемость эмбрионов с нормальным кариотипом у отцов с нормальным уровнем фрагментации ДНК значимо выше. Некоторые авторы связывают нарушения репродуктивной функции мужчин с фрагментацией ДНК. Была показана корреляция фрагментации ДНК с отклонениями параметров спермы от нормальных, включая хромосомные аномалии [Cohen-Bacrie P. et al., 2009]. Более того, фрагментация ДНК и дисперсия хроматина были повышены у бесплодных мужчин, и в особенности у пациентов с олигоастенотератоспермией [Belloc S. et al., 2014]. Проведенный нами анализ частоты трисомий и моносомий по аутосомам не выявил статистически значимых различий между подгруппами с нормальным и повышенным уровнем фрагментации ДНК, несмотря на некоторую тенденцию к их увеличению. Вместе с тем повышение уровня фрагментации ДНК сопровождалось увеличением частоты эмбрионов с синдромом Шерешевского-Тернера.

В рамках данной работы также было обнаружено существенное увеличение частоты делеций и дупликаций у эмбрионов в парах с повышенным уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов, что позволяет предполагать возможность передачи нарушений в структуре ДНК сперматозоидов в генетический материал эмбриона. Важно отметить, что согласно ряду исследований, повреждение семенной ДНК оказывает отрицательное влияние на оплодотворение и частоту имплантации эмбрионов и играет сопричастную роль в наступлении спонтанных аборт в ситуациях естественного наступления беременности [Ferraretti A.P. et al., 2004; Kahraman S. et al., 2004; Kahraman S. et al., 2006; Rubio C. et al., 2007; Sills E. S. et al., 2014, Sakkas D. et al., 2010]. Более того, вероятность неблагоприятного исхода значительно возрастает в тех случаях, когда эмбрионы трансплантируются без ПГС [Chow J.F et al., 2014].

Таким образом, повышенный уровень фрагментации ДНК ядра сперматозоидов является существенным признаком, при наличии которого следует прописывать пациентам ПГС в ходе осуществления цикла ВРТ. Действительно, многие авторы предлагают введение анализа на целостность семенной ДНК в клиническую практику при работе с бесплодными парами в совокупности с предваряющими обследованиями. Особенно это исследование актуально для мужчин с показателями спермограммы, близкими к нормальным, у которых не обнаружено нарушений в кариотипе или других явных причин бесплодия, в случаях неудачных попыток ЭКО, ИКСИ или привычного невынашивания. Исследование фрагментации ДНК сперматозоидов может выступать эффективным диагностическим методом, выявляющим нарушения фертильности у мужчин [Руднева С.А. и соавт., 2014; Gianaroli L. et al., 2005].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования позволяют подвести *следующие итоги*:

1. Характеристики сперматозоидов отца оказывают значимое влияние на результаты предимплантационного генетического скрининга эмбрионов, полученных методом ИКСИ.
2. При концентрации сперматозоидов ниже нормы ВОЗ, составляющей 15 млн/мл, наблюдается статистически значимое повышение частоты эмбрионов с кариотипом *45, X0*.
3. Снижение содержания морфологически нормальных сперматозоидов в эякуляте (менее 4%) сопровождается достоверным увеличением встречаемости в кариотипе эмбрионов численных аномалий аутосом, делеций и дупликаций, а также повышением риска рождения ребенка с синдромом Клайнфельтера.
4. Значимого влияния подвижности сперматозоидов на результаты предимплантационного генетического скрининга эмбрионов не обнаружено, что можно объяснить техникой оплодотворения методом ИКСИ, при которой выбор сперматозоида с помощью микроманипулятора нивелирует влияние ослабленной подвижности сперматозоидов.
5. У отцов с уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов, превышающим 15%, достоверно увеличена частота эмбрионов с делециями и дупликациями в хромосомах, а также с кариотипом *45, X0*, что свидетельствует о возрастании риска рождения ребенка с синдромом Шерешевского-Тернера у мужчин с повышенным уровнем фрагментации ДНК ядра сперматозоидов.

Практические рекомендации

1. Для более точного прогнозирования исхода программы ВРТ необходимо уделять большее внимание диагностике патологии сперматозоидов.
2. Рекомендуется введение определения уровня фрагментации ДНК в перечень обязательных анализов, предшествующих вступлению бесплодной пары в программу ВРТ.
3. Если у мужчины выявляются отклонения в функциональных показателях сперматозоидов, целесообразно выполнять предимплантационный генетический скрининг для снижения риска рождения ребенка с синдромами Клайнфельтера, Шерешевского-Тернера и другими заболеваниями, обусловленными изменением числа и структуры хромосом. Это также позволит снизить риск невынашивания беременности и самопроизвольного абортирования плода, связанных с наличием аномалий в кариотипе эмбриона.

**Список научных работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях,
рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ**

1. Киселева Ю.Ю., Азова М.М., Кодылева Т.А., Ушакова И.В., Кириллова А.О., Ракитько А.С., Володяева Т.О., Мишиева Н.Г., Абубакиров А.Н. В парах с мужским фактором бесплодия увеличен риск рождения ребенка с синдромом Клайнфелтера // Проблемы репродукции. – 2016. – Т. 22, №6. – С. 74-77.
2. Киселева Ю.Ю., Кодылева Т.А., Кириллова А.О. Использование скрининговых тестов на выявление наиболее распространенных мутаций перед программой вспомогательных репродуктивных технологий // Проблемы репродукции. – 2017. – Т. 23, №2. – С. 47-49.
3. Киселева Ю.Ю., Азова М.М., Кириллова А.О., Желудова Е.М. Увеличение риска рождения ребенка с синдромом Шерешевского-Тернера при мужском факторе бесплодия // Технологии живых систем. – 2017. - №3. – С.24-27.
4. Киселева Ю.Ю., Азова М.М., Кодылева Т.А., Ушакова И.В., Кириллова А.О., Екимов А.О., Ракитько А.С., Володяева Т.О., Мишиева Н.Г., Абубакиров А.Н. Результаты предимплантационного генетического скрининга эмбрионов у супружеских пар с фрагментацией ДНК сперматозоидов // Акушерство и Гинекология. – 2017. - №8. – С. 104-108.

Работы, опубликованные в других изданиях

1. Киселева Ю.Ю., Ушакова И.В., Абубакиров А.Н., Божедомов В.А. Подготовка эякулята пациентов с аутоиммунным бесплодием для использования в программах ВРТ// Репродуктивные технологии сегодня и завтра Материалы XXIII Международной конференции Российской Ассоциации Репродукции Человека (4—7 сентября 2013 г., Волгоград). – С. 111-112.
2. Kiseleva J., Kodileva T., Ushakova I., Golubeva O., Volodjaeva T., Abubakirov A., Mishieva N. The Influence of high values of sperm DNA fragmentation on the quality and genotype of the embryos // Human reproduction. – Vol. 31, Suppl 1. Abstracts of the 32nd Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. – 2016. – P.115.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CGH – comparative genome hybridization, сравнительная геномная гибридизация.

ET – embryo transfer, перенос эмбриона в полость матки.

FISH – метод многоцветной флуоресцентной гибридизации *in situ*

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ИКСИ – от англ. *ICSI* — *Intra Cytoplasmic Sperm Injection*, введение сперматозоида в цитоплазму, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида

ПГД – предимплантационная генетическая диагностика эмбрионов

ПГС – предимплантационный генетический скрининг эмбрионов

СГГ – сравнительная геномная гибридизация

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

РЕЗЮМЕ

кандидатской диссертации Киселевой Юлии Юрьевны

«Роль функциональных показателей сперматозоидов отца в программах предимплантационного генетического скрининга эмбрионов»

Работа посвящена исследованию ассоциации отклонений в функциональных параметрах сперматозоидов с изменениями числа и структуры хромосом эмбрионов. Несмотря на то, что потенциально сперма низкого качества (по результатам спермограммы и уровню фрагментации ДНК) должна вносить отрицательный вклад в клинические исходы ВРТ, исследований, непосредственно демонстрирующих влияние параметров сперматозоидов отца на кариотип эмбрионов, недостаточно, и настоящая работа способствует расширению имеющихся представлений по данному вопросу. Полученные нами данные позволяют полагать, что отбор эмбрионов посредством предимплантационного генетического скрининга значительно уменьшает вероятность неблагоприятного исхода цикла ВРТ для пар, в которых у мужчины диагностирована патология сперматозоидов.

SUMMARY
of the thesis «The role of sperm functional parameters in programs of preimplantation genetic screening of embryos» by Kiseleva Yulia Yurievna

The work is concerned with association between abnormalities in sperm functional parameters and changes in the number and structure of chromosomes in embryos. In spite of the fact that semen of low quality (based on results of semen analysis and DNA fragmentation) may make a negative contribution to clinical outcomes of assisted reproductive technologies, studies directly demonstrating the influence of sperm parameters on the embryonic karyotype are insufficient, and the present work contributes to the extension of current ideas on this subject. In accordance with our results, the selection of embryos with the use of preimplantation genetic screening significantly reduces the probability of an unfavourable outcome of in vitro fertilisation for couples where the man has pathology of the sperm.