

УДК: 575.155

Связь количественных хромосомных аномалий сперматозоидов и преимплантационных эмбрионов

Гонтарь Ю.В., Ильин И.Е., Будерацкая Н.А.

Современная генетическая диагностика позволяет установить хромосомные нерасхождения не только в постнатальном и пренатальном периодах, но также в половых клетках и ранних эмбрионах. Так, в сперматозоидах наиболее распространено нерасхождение по 18 и половым хромосомам. В преимплантационных эмбрионах наиболее встречаемые анеуплоидии по 21 и 18 хромосомам. Доля аномальных эмбрионов в целом составила 65, 2 %, что указывает на наиболее эффективную элиминацию нежизнеспособных эмбрионов на раннем преимплантационном этапе.

Ключевые слова: анеуплоидии, преимплантационный генетический скрининг, эмбрион, сперматозоид, флуоресцентная *in situ* гибридизация.

Communication quantitative chromosomal abnormalities of spermatozoa and preimplantation embryos

Gontar Y.V., Ilyin I.E., Budeatskaya N.A.

Modern genetic diagnosis allows to establish chromosomal nondisjunction not only in postnatal and prenatal periods, but also in germ cells and early embryos. Thus, the most common nondisjunction in sperm are 18 and sex chromosomes. The most common aneuploidy in preimplantation embryos are chromosomes 21 and 18. Win abnormal embryos was 65, 2 %, which indicates that the most effective elimination of nonviable embryos in early preimplantation stage.

Keywords: aneuploidy, preimplantation genetic screening, embryo, spermatozoa, fluorescent *in situ* hybridization.

Введение

Современная репродуктивная генетика направлена не только на выявление генетических нарушений, но и, прежде всего, на предупреждение рождения детей с патологиями. Количественные хромосомные аномалии, которые

могут возникнуть на различных стадиях развития эмбрионов, чаще всего являются причиной нарушения имплантации, спонтанных самоабортов или множественных пороков развития плода. Частота невынашивания беременности в мировой популяции составляет 20 %. В структуре невынашивания частота привычного выкидыша колеблется от 5 % до 20 %, а единичных случаев замирания беременности — 45—88, 6 % от числа самопроизвольных выкидышей на ранних сроках (6—8 недель гестации). При исследовании материала выкидышей большинство обнаруженных хромосомных нарушений имели количественную этиологию (95 %) [4]. В сроке гестации 10—12 недель хромосомные аномалии составляют 4, 5—7 %, а во втором триместре — 2—3 %. Что касается новорожденных, то частота структурных и количественных хромосомных отклонений встречается в 0, 6—0, 7 % [9]. Данная тенденция указывает на существование природного отбора на генетическом уровне, снижая, таким образом, рождение нежизнеспособных особей в общей человеческой популяции.

Благодаря развитию методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и введению в широкую практику технологии микроманипуляций с отдельными клетками, стало возможным выполнять скрининговые исследования определенной группы хромосомных аномалий в эмбрионах до переноса их в матку. По данным зарубежных авторов, применение сравнительной геномной гибридизации, которая позволяет оценить весь хромосомный набор, дало возможность установить, что доля эуплоидных эмбрионов, полученных в циклах оплодотворения *in vitro*, составила всего лишь 25 %.

Причины хромосомных нарушений:

- 1) сбой мейотического деления: случаи нерасхождения гомологичных хромосом, что приводит к появлению моносомии или трисомии. Нерасхождение хромосом в яйцеклетках и сперматозоидах может произойти в любом периоде мейотического деления;
- 2) аномальный процесс кроссинговера при мейотическом делении гамет (например, обмен участками негомологичных хромосом);
- 3) проблемы, возникающие при оплодотворении: случаи оплодотворения ооцита двумя сперматозоидами (диспермия), в результате возникает триплоидный эмбрион;
- 4) нарушения первых митотических делений: полная тетраплоидия, возникающая при первом делении митоза, приводит к удвоению хромосом и отсутствию деления цитоплазмы;
- 5) возникновение мозаицизма на этапе митотического деления эмбриона при ненормальном расхождении хромосом в клетках эмбриона, начиная со второго клеточного деления после образования зиготы. [6]

Установить хромосомный набор ооцита или сперматозоида с применением современных методов возможно, но для этого требуется «убить» клетку. Для теоретического определения хромосомного состава яйцеклетки исследуются полярные тельца, но данное исследование не гарантирует установление хромосомного набора зрелого ооцита, готового к оплодотворению. Поэтому чаще всего нарушения ооцитарного происхождения оцениваются по результатам преимплантационной генетической диагностики.

Мужские половые клетки более доступны для хромосомного анализа, а именно вычисляется доля хромосомных нерасхождений в подвижной фракции сперматозоидов. Ранее, хромосомные аномалии приписывали, прежде всего, нарушениям в женской половой клетке [1]. Но сперматозоиды также играют большую роль в возникновении анеуплоидий эмбриона и его морфокинетическое развитие[5].

Цель исследования

Целью исследования является установить влияние нарушения качественных показателей мужских генеративных клеток на эуплоидность и морфологическое качество ранних эмбрионов среди пациентов с диагнозом «бесплодие», определить доли хромосомных нарушений в бластомерах эмбрионов в соответствии с панелью исследования.

Материал и методы исследования

Сбор первичной информации проводился на базе диагностической лаборатории ООО «Медицинский центр ИГР» (директор — к.мед.н., И.Е. Ильин) в период с 2013 по 2014 гг. Каждый пациент, обращаясь впервые в медицинский центр, был предупрежден об использовании его личной информации и подписывал «Информированное согласие» на обработку его персональных данных. Процедура информирования проводилась в соответствии с «Положением о порядке обработки персональных данных пациентов ООО «Медицинский центр ИГР»», которое разработано на основе Закона Украины «Про защиту персональных данных» № 1/20314 от 03.01.2012 года. Внутренний документ об информированном соглашении был утвержден медицинским советом ООО «Медицинский центр ИГР» (протокол заседания № 6 от 12.08.2013 года).

Пациенты, которые включены в данное исследование, проходили с диагнозом «бесплодие». Обработаны результаты обследования 259 мужчин, которым назначалось исследование эякулята. Возраст пациентов варьировал от 20 до 61 года, средний возраст данной группы исследуемых составил $36, 3 \pm$

7, 14 лет. Также в этот период был проведен преимплантационный генетический скрининг хромосомных аномалий эмбрионов, полученных в 72 циклах оплодотворения *in vitro*, суммарно 664 эмбриона. Возраст пациенток, которые проходили лечение в программах ВРТ в комбинации с преимплантационным генетическим скринингом, находился в диапазоне от 22 до 42 лет. Таким образом, средний возраст женщин равен $31, 8 \pm 5, 22$ годам.

Мужчинам с нарушением сперматогенеза проводилось молекулярно-цитогенетическое исследование методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) на сперматозоидах с предварительной их деконденсацией. С целью определения уровня анеуплоидий сперматозоидов использовали многоцветную пробу AneuVysion для хромосом X, Y, 18, 13, 21 (производитель Abbott, США).

Подготовка препаратов производилась после сдачи пациентом эякулята. Необходимый объем спермы помещался в пробирку и трижды отмывался фосфатным буфером. После этого осадок раскапывался на стёкла и сушился 1 час при температуре + 50 С. В дальнейшем стекла опускались в емкость с фиксатором и оставлялись на 18 часов при температуре - 20 С. По прошествии указанного времени проводилась деконденсация путем инкубации в 0, 1 N растворе гидроксида натрия. Затем стекла ополаскивались в фосфатном буфере и просушивались на воздухе. Далее проводилась предгибридизационная подготовка препарата, и наносились пробы CEP 18/X/Y и LSI 13/21 на предварительно отмеченные зоны гибридизации. Стекло с нанесенными зондами помещалось в гибридизатор с установленной программой денатурации и гибридизации при + 37° С длительностью от 4 до 12 часов. Затем для удаления негибридизовавшихся проб стекла подвергались отмывке. Далее препараты окрашивались, и проводилась детекция флуоресцентных сигналов согласно стандартному протоколу. Для исследования уровня анеуплоидий в сперматозоидах проводился анализ 1000 клеток. [2].

Исследование уровня фрагментации ДНК проводился методом SCD (Sperm Chromatin Dispersion test) с использованием коммерческого набора Halosperm (производство Halotech dna, Испания). При этом подсчитывалось 500 клеток, и оценивался размер ореола вокруг головы сперматозоида.

Исследование аномальной конденсации хроматина выполнялось с применением анилинового теста с использованием красителя метиленовый синий. При этом вся головка сперматозоида окрашивалась в темный цвет, если половая клетка несет белки, характерные для незрелого сперматозоида, в то время как зрелые сперматозоиды имеют «светлую» неокрашенную головку.

Для определения уровня аномальной конденсации хроматина подсчитывалось 200 сперматозоидов в исследуемом образце.

Материал для преимплантационного скрининга был получен путем аспирации одной клетки (бластомера) эмбриона на станции 8 клеток, при этом клетки обладают тотипатентными свойствами [8]. Полученный бластомер после обработки гипотоническим раствором (1 % цитрат натрия) фиксировался на стекле с помощью смеси метанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1 (фиксатор Карнуа). Последующим этапом являлось нанесение флуоресцентных ДНК-зондов в зону, где находились ядра клеток эмбриона. Обычно используются зонды для хромосом 13, 16, 18, 21, 22, X, Y, исследования которых обеспечивают коммерческие наборы PB MultiVysion и CerX/CerY (производитель Abbott, США) Стекло с нанесенными зондами помещалось в гибридизатор с установленной программой денатурации и гибридизации при +37° С длительностью от 4 до 12 часов. Постгибридизационная обработка включала отмывку в растворе 0, 7xSSC/0, 4 % NP-40 при температуре +73° С (7 минут) и 2xSSC/0, 1 % NP-40 при комнатной температуре (1 минута). Микроскопический анализ осуществлялся с использованием флуоресцентного микроскопа Olympus BX 51 (производство США), оборудованного соответствующим набором фильтров и программой автоматической обработки изображения, в данном случае программа ISIS (производство Meta Systems, Германия).

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование строилось на результатах анализов эякулята 259 пациентов и 72 циклов оплодотворения *in vitro*.

По данным молекулярно-цитогенетического анализа методом FISH уровень анеуплоидий в сперматозоидах был в диапазоне от 1, 8 % до 23, 7 %, тогда как в норме процент нерасхождений хромосом не должен превышать 2, 5 % [5]. При анализе сперматозоидов встречались следующие варианты анеуплоидий: наличие двух половых хромосом (XX, YY, XY), нулисомия по половым хромосомам, наличие нескольких половых хромосом и аутосом (XXY 1818, XX 1818, XY 1818, XYY 1818), нулисомия по аутосомным хромосомам (X_, Y_, 13_, 21_), присутствие нескольких аутосом (1313 21, 13 2121, 1313 2121). Обобщенные данные по анеуплоидиям сперматозоидов представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Вариабельность показателя анеуплоидий сперматозоидов

Исследованные хромосомы	Среднее значение Нерасхождения на 1000 клеток, %	Норма, %	Доля нерасхождения хромосомы в сперматозоидах, %
X/Y	2, 71 ± 1, 73	0, 5	30, 21
13	1, 86 ± 1, 36	0, 5	20, 74
18	2, 36 ± 1, 54	0, 5	26, 31
21	2, 02 ± 1, 24	0, 5	22, 74
Общее количество анеуплоидий (13,18, 21,X/Y)	8, 97 ± 4, 26	2, 5	100

Самые высокие уровни нерасхождения хромосом в сперматозоидах задействованы 18 и половые хромосомы.

В зависимости от возраста тенденция нерасхождения хромосом в мужских половых клетках неоднородна. Но в соответствии с проведенным анализом тенденция к снижению уровня анеуплоидий наблюдается с увеличением возраста, что, скорее всего, объясняется стилем жизни (снижение частоты половых контактов, соответственно уменьшение вероятности острых воспалительных состояний, а также увеличивается временной промежуток между эякуляциями, способствующую полному созреванию генеративных клеток и т.п.). Указанную зависимость отображает рисунок 1. Данные по каждой точке возраста усреднены в соответствии с численностью мужчин по каждому возрастному показателю.

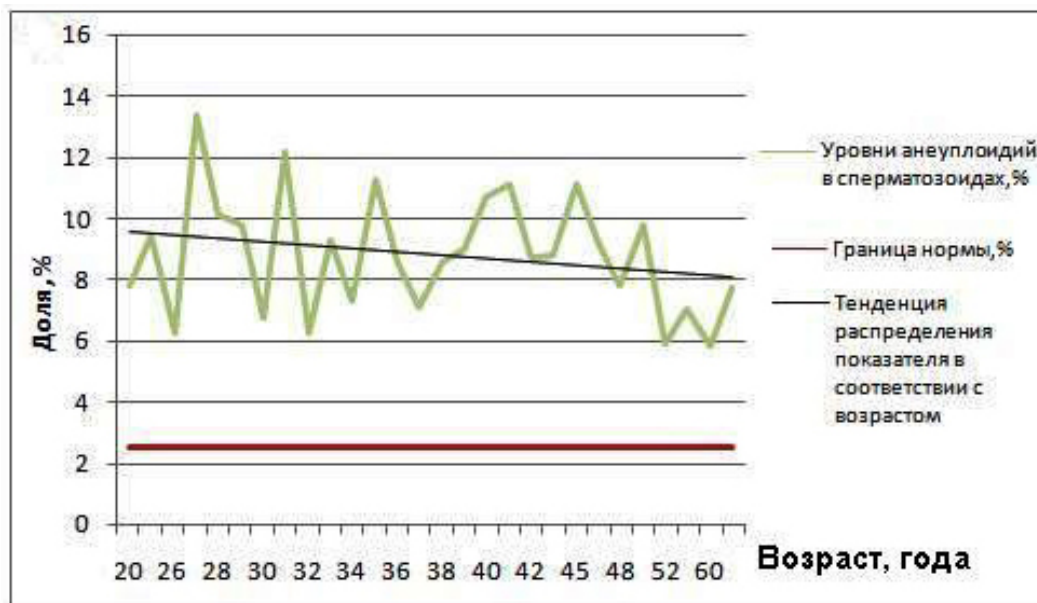


Рисунок 1 — распределение уровней нерасхождения хромосом в сперматозоидах в зависимости от возраста обследуемых

Кроме уровня анеуплоидий сперматозоидов существует множество других показателей, связанных с качественными характеристиками эякулята. Это уровень фрагментации ДНК сперматозоидов, аномальной конденсации хроматина сперматозоида, морфология и другие. Некоторые показатели имеют взаимосвязь. В таблице 2 сведены данные о пациентах с превышающими норму уровнями той или иной характеристики и выведена доля случаев, при которых показатели комбинировались.

Таблица 2 — Взаимосвязь показателей эякулята

		Показатель, превышающий норму в комбинации с другой характеристикой эякулята, %					
Группы по показателям, превышающим норму у 100 %	Показатель	Нерасхождение хромосом (FISH)	Фрагментация ДНК	Аномальная конденсация хроматина	Морфология	Подвижность	Концентрация
	Нерасхождение хромосом (FISH)	-	28, 3	27, 3	54, 5	44, 2	52, 7
	Фрагментация ДНК	75, 7	-	51, 6	55, 6	68, 1	49, 1
	Аномальная конденсация хроматина	28, 6	53, 8	-	66, 7	85, 7	66, 7

Морфология	100	30, 6	43, 8	-	63, 6	71, 2
Подвижность	43, 5	23, 6	23, 9	76, 3	-	65, 2
Концентрация	44, 7	21, 6	47, 9	32, 8	87, 8	-

Таким образом, если рассмотреть группу, в которой у 100 % мужчин был повышен уровень анеуплоидий в сперматозоидах, то в этой же группе уровень фрагментации ДНК был вне нормы у 28, 3 % пациентов, повышенный показатель по аномальной конденсации хроматина сперматозоидов наблюдался у 27, 3 %, морфология генеративных клеток превышала допустимые границы у 54, 5 %, снижена подвижность сперматозоидов была у 44, 2 %, а также низкая концентрация клеток в эякуляте установлена у 52, 7 % мужчин. При этом обращает на себя внимание группа пациентов с аномальной морфологией сперматозоидов. В 100 % случаев было установлено повышение уровня нерасхождения хромосом в мужских гаметах. Следует заметить, что прослеживается взаимосвязь между уровнем анеуплоидий в сперматозоидах и морфологией, концентрацией и уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов.

Качественные показатели эякулята также оказывают влияние на морфологию эмбрионов, а именно на процесс бластуляции. Считается, что наиболее перспективные для имплантации бластоцисты (эмбрион на пятые сутки культивирования) должны иметь градацию 5АА по классификации Д. Гарднера. На рисунке 2 представлено влияние качественных характеристик эякулята, отличающихся от нормы, на количество эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты класса 5АА. Проанализированы данные по 506 эмбрионам.

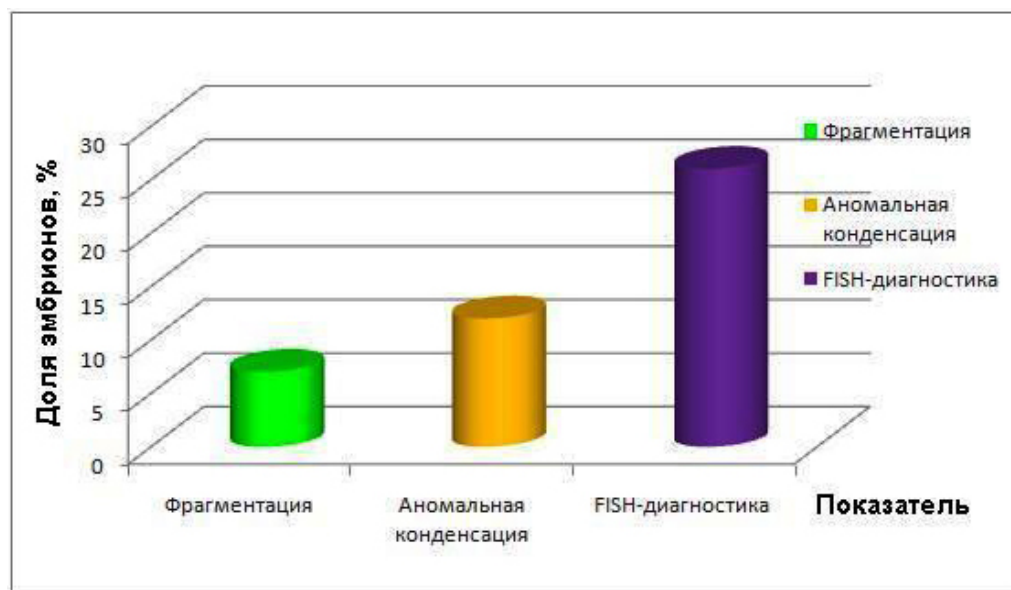


Рисунок 2 — Доля бластоцист 5АА (по Гарднеру) от общего количества эмбрионов при показателях эякулята, отличающихся от нормы

Таким образом, повышенный уровень фрагментации ДНК сперматозоидов оказывает наиболее негативное воздействие на морфологические характеристики эмбрионов.

При сочетании двух показателей эякулята, отличающихся от нормы, также наблюдается тенденция к снижению количества жизнеспособных эмбрионов. На рисунке 3 отображена зависимость между количеством эуплоидных эмбрионов, наступлением бластуляции и комбинацией нарушений в эякуляте.

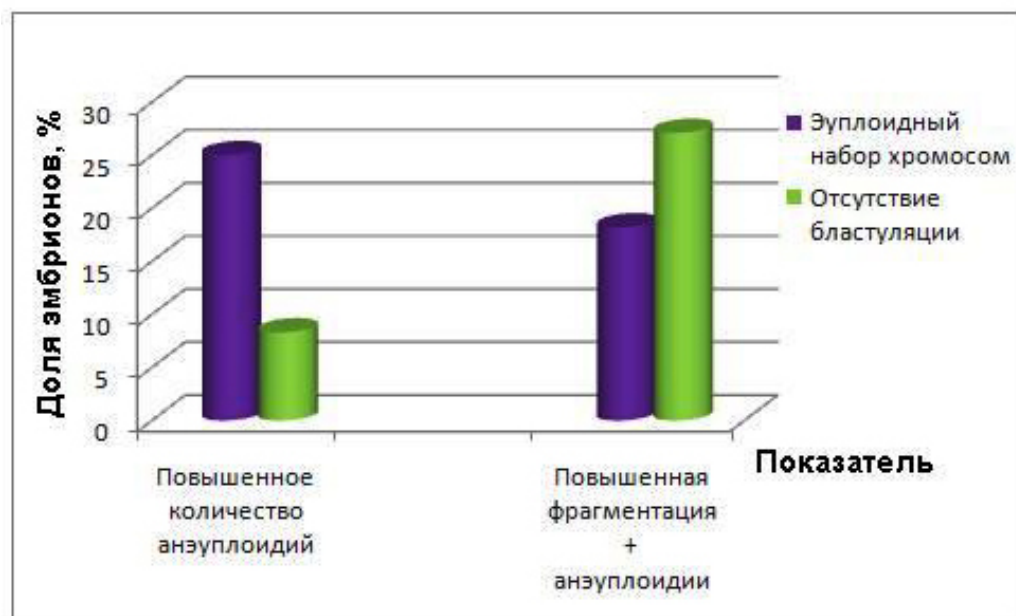


Рисунок 3 — Взаимосвязь показателей FISH-диагностики и фрагментации ДНК сперматозоидов с результатами ПГД и морфологическим качеством эмбрионов

Наличие двух качественных характеристик сперматозоидов, отличающихся от нормы, снижают выход бластоцист и влияют на эуплоидность эмбрионов в сравнении с одним ненормальным показателем эякулята.

В связи с высоким риском пациентов с бесплодием иметь аномальную беременность, в «Медицинском центре ИГР» выполняется ряд предупреждающих мероприятий, одно из которых преимплантационный генетический скрининг (ПГС).

В соответствии с данными, представленными в исследовании, ПГС проводился по 7 хромосомам 664 эмбрионов, полученных в 72 циклах оплодотворения *in vitro*. Среди исследованных эмбрионов лишь 34, 8% были эуплоидными по проанализированным хромосомам, что соотносится с данными литературы [7]. В среднем на каждый цикл диагностики приходилось по 3, 2 эуплоидных эмбриона. Другие 433 эмбриона имели аномалии хромосомного набора, среди которых 19, 8 % составляли нарушения уровня ploidy, в том числе гаплоидия (44 эмбриона) и триплоидия (16 эмбрионов). Следует указать, что 182 аномальных эмбриона имели сложные нарушения хромосомного набора, основная часть которых (53, 3 %) была представлена __ одновременной потерей и приобретением различных хромосом. Подобное нарушение, вероятно, возникает вследствие комплексного нерасхождения гомологов при митотическом делении бластомеров. Соотношение мужского и женского пола обследованных эмбрионов составило 47, 5 % и 52, 5 % соот-

ответственно, что соотносится с теоретически ожидаемым распределением. Основной количественной аномалией половых хромосом выступала моносомия половой хромосомы X (37 случаев).

Зависимость эуплоидности и возраста матери представлена на рисунке 4. Данные по каждой точке возраста усреднены в соответствии с численностью пациенток по каждому возрастному показателю.

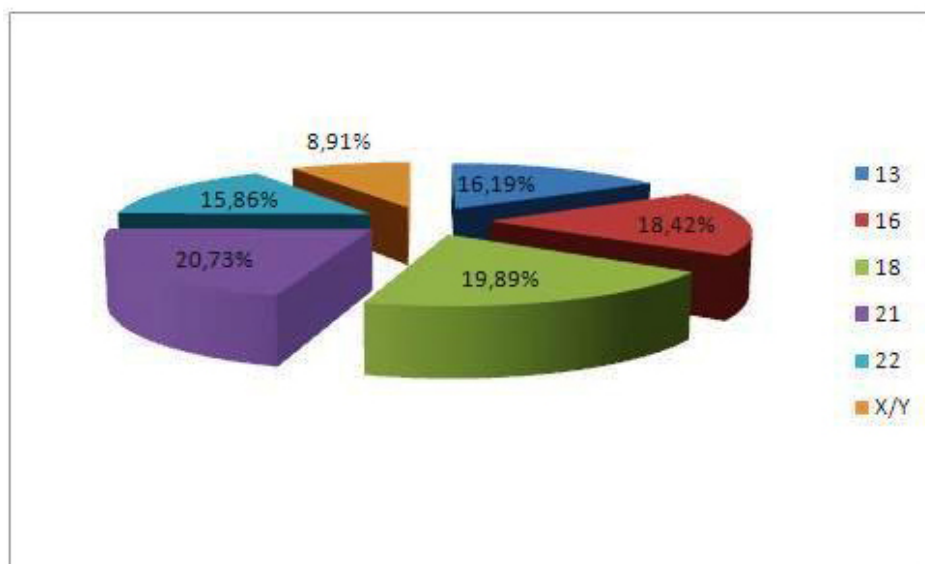


Рисунок 4 — Распределение количества эуплоидных эмбрионов в зависимости от возраста пациенток

Как и ожидалось, с увеличением возраста женщин количество хромосомно нормальных эмбрионов снижается, что соответствует мировым литературным данным [10].

Статистический анализ общих частот анеуплоидий отдельных хромосом, показал, что взносы каждой из проанализированных аутосом в формирование хромосомной патологии преимплантационной эмбрионов существенно не отличаются и варьируют в пределах 8, 9—20, 7 %, что демонстрирует рисунок 5.

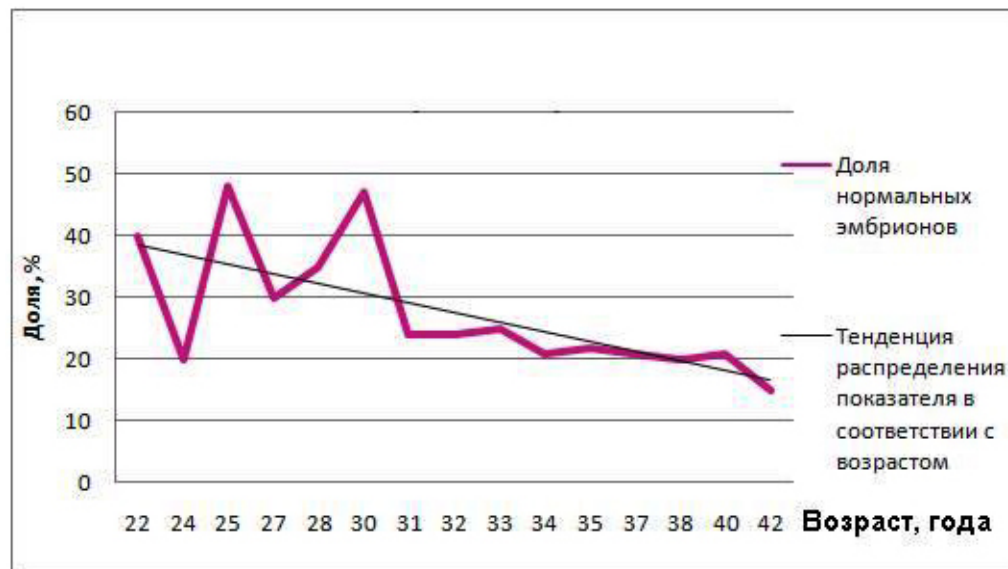


Рисунок 5 — Общее распределение анеуплоидий отдельных хромосом среди аномалий эмбрионов

Существенную часть в полисомных вариантах составляет хромосома 21. Таким образом, данная патология преобладает как в постнатальном, так и в преимплантационном этапе развития. Также одной из частых трисомий в преимплантационных эмбрионах является анеуплоидия по хромосоме 18, но постнатально встречается реже в связи с тяжелыми пороками развития плода.

По данным исследователей при молекулярно-генетическом анализе линий стволовых клеток, полученных с генетически аномальных эмбрионов, было установлено, что паттерн экспрессии клеток трисомией 21 был ближе других к контрольному профилю [3].

Как известно, трисомия 21 имеет, в основном, материнское происхождение и напрямую зависит от возраста [10]. В свою очередь, анализ сперматозоидов показал, что мужским половым клеткам присуща анеуплоидия по хромосоме 18, что также критично отображается на хромосомном наборе эмбрионов.

Выводы

Аномалии хромосомного набора по хромосомам 13, 16, 18, 21, 22, X и Y были характерны для 65, 2 % преимплантационных эмбрионов, что значительно превышает уровень хромосомных аномалий в пренатальном этапе развития. От момента образования зиготы до момента рождения ребенка выражена тенденция на уменьшение доли эмбрионов с хромосомными нарушениями. Соответственно, самый эффективный отбор и элиминация нежизне-

способных эмбрионов происходит именно на стадии преимплантационных эмбрионов. Выявлено характерное привнесение анеуплоидии 21 через ооцит, а также анеуплоидии 18 через сперматозоид. Очевидно, хромосомный состав эмбриона, напрямую, зависит от набора хромосом в гаметах, а также их морфологических и качественных характеристик. Поэтому необходимо уделять большое внимание диагностике кариотипа и генеративных клеток, в частности сперматозоидов, до введения пациентов в циклы оплодотворения *in vitro* для повышения эффективности преимплантационной диагностики и составления более точного прогноза в исходе программы ВРТ.

Литература

1. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты.//СПб.: Научная литература, 2007. — С. 252—310.
2. Ворсанова С.В., Юров Ю.Г., Чернышов В.Н. Медицинская цитогенетика// Москва, 2006. — С. 219—222.
3. Biancotti J.- C. Human embryonic stem cells as models for aneuploid chromosomal syndromes// Stem cells. — 2010. — Vol.28. — P. 1530 — 1540.
4. Bricker L. Types of pregnancy loss in recurrent miscarriage: implications for research and clinical practice //Hum. Reprod., 2002. — Vol. 17, N 5. — P. 1345—1350
5. Carrell D.T. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises // J Androl.,2008. — Vol. 29(2). — P.124—33.
6. Gersen S. L. The principles of clinical Cytogenetics//New York: Springer, 2013. — P. 275—292
7. Harper J.C. Preimplantation genetic diagnosis//CambridgeUniversity Press, 2009. — P. 95—116
8. Harton1 G.L. at al. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group. Best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for pre-implantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS)//Human Reproduction, 2010. — Vol.1. — P. 1—8.
9. Nielsen J. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark.// Hum Genet., 1991. — Vol.87(1). — P. 81—3.
10. McKinlay Gardner R.J. Chromosome abnormalities and genetic counseling//New York: Oxford University Press, Inc., 2012, — P. 27—66, P. 377—402

Literature

1. Baranov V.S., Kuznecova T.V. Citogenetika jembrional'nogo razvitija čeloveka: nauchno-praktičeskie aspekty.//SPb.: Nauchnaja literatura, 2007. — S. 252—310.
2. Vorsanova S.V., Jurov Ju.G., Chernyšov V.N. Medicinskaja citogenetika// Moskva, 2006. — S. 219—222.
3. Biancotti J.- C. Human embryonic stem cells as models for aneuploid chromosomal syndromes// Stem cells. — 2010. — Vol.28. — P. 1530 — 1540.
4. Bricker L. Types of pregnancy loss in recurrent miscarriage: implications for research and clinical practice //Hum. Reprod., 2002. — Vol. 17, N 5. — P. 1345—1350
5. Carrell D.T. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises // J Androl.,2008. — Vol. 29(2). — P.124—33.
6. Gersen S. L. The principles of clinical Cytogenetics//New York: Springer, 2013. — P. 275—292
7. Harper J.C. Preimplantation genetic diagnosis//CambridgeUniversity Press, 2009. — P. 95—116
8. Harton1 G.L. at al. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group. Best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS)//Human Reproduction, 2010. — Vol.1. — P. 1—8.
9. Nielsen J. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark.// Hum Genet., 1991. — Vol.87(1). — P. 81—3.
10. McKinlay Gardner R.J. Chromosome abnormalities and genetic counseling//New York: Oxford University Press, Inc., 2012, — P. 27—66, P. 377—402