

АНАЛИЗ СВЯЗИ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК И АНЕУПЛОИДИЙ СПЕРМЫ С ПАРАМЕТРАМИ РАННИХ ЭМБРИОНОВ

В настоящее время около 15% супружеских пар сталкиваются с проблемой бесплодия. При этом практически в 60% случаев причиной ненаступления беременности в паре являются нарушения мужской фертильности [1, 2], которые в 13% случаев обусловлены нарушениями плоидности, хромосомными aberrациями, микроделециями, генными мутациями самих мужчин. Необходимо также учитывать результаты нарушения сперматогенеза – анеуплоидии, повреждения ДНК и нарушения компактизации хроматина сперматозоидов [3]. Фрагментация ДНК сперматозоидов представляет собой одно- и двухцепочечные разрывы молекулы ДНК, возникающие в результате процессов изменения структуры хроматина в ходе сперматогенеза и апоптоза [4–7]. Наличие хромосомных нарушений в сперме и оплодотворение ооцитов анеуплоидными сперматозоидами ведет к формированию эмбрионов с аномальным кариотипом, что является причиной ненаступления имплантации или остановки развития эмбрионов на ранних этапах развития [8–12]. В то же время согласно данным ряда авторов влияние фрагментации ДНК спермы на возможность наступления беременности не доказано [13]. Одним из главных критериев нормального развития эмбриона является формирование бластоцисты на пятые сутки культивирования. Индекс частоты формирования бластоцист (ЧФБ) принято рассматривать как один из основных критериев для выбора эмбриона, способного к имплантации [14, 15]. В приведенных ранее другими авторами результатах показано влияние фрагментации ДНК спермы на общее количество бластоцист, полученных при лечении бесплодия методами ВРТ, однако связь нарушения компактизации хроматина с качеством бластоцист представлена недостаточно хорошо [16]. Учитывая тот факт, что фрагментация ДНК спермы является мультифакторным признаком, вклад в средовую компоненту которого вносят табакокурение,

алкоголь, прием ряда препаратов и другие факторы окружающей среды, данный параметр необходимо рассматривать отдельно в каждой популяции [17]. В связи с вышеизложенным целью данной работы стало исследование связи между количественными и качественными характеристиками бластоцист и уровнем анеуплоидий и фрагментации ДНК в сперме при получении эмбрионов методами вспомогательных репродуктивных технологий.

Материалы и методы

Для проведения исследования было сформировано 2 группы пациентов. В группе 1 (n=30) у мужчин оценивался уровень фрагментации ДНК сперматозоидов, для пациентов группы 2 (n=49) определялся уровень анеуплоидий в сперме. Анализировалась связь между полученными характеристиками, общим индексом ЧФБ и качеством бластоцист. Для анализа фрагментации ДНК сперматозоидов использован метод SCD (sperm chromatin dispersion) (HaloSperm, Halotech, Испания) [18]. Анализ проведен с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse 80i. Исследование анеуплоидий в ядрах сперматозоидов выполнено методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [19]. Для каждого пациента было оценено не менее 400 ядер сперматозоидов. Для контролируемой стимуляции овуляции (КСО) с целью получения ооцитов применяли протокол с агонистами гонадотропин-рилизинг-гормона (аГнРГ). В каждом случае стимуляция овуляции занимала не менее десяти дней. В день трансвагинальной пункции средний размер фолликулов достигал 18 мм. Для поддержки лютеиновой фазы были использованы препараты прогестеронового ряда. Полученные зиготы и эмбрионы культивировались в среде Global Total (LifeGlobal Group) при температуре 36,8–37,1 °С, при содержании CO₂ 5,5–5,9%. Проверка распределения количественных

дат на соответствие закону нормального распределения выполнена путем определения показателей асимметрии и эксцесса. Исследование связей между признаками проводилось с помощью корреляционного анализа по Спирмену [20].

Результаты и обсуждение

При проведении данного исследования качество эмбрионов оценивалось на основании его морфологии (внешних признаков) (рис.) [21]. Учитывались размеры эмбриона – ранняя бластоциста или полностью вылупившаяся, качество трофобласта и внутренней клеточной массы.

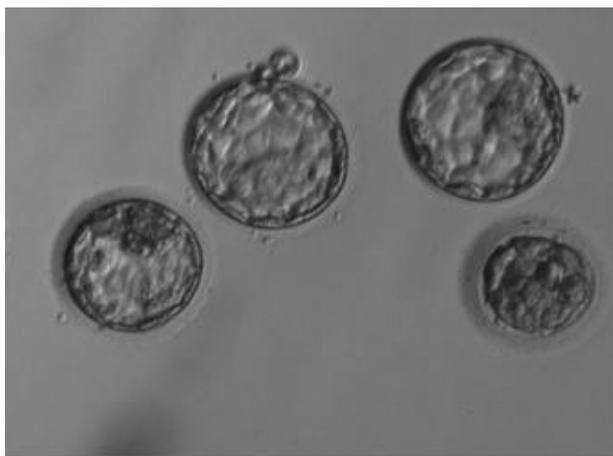
По рекомендациям Европейской ассоциации урологов доля сперматозоидов в эякуляте, содержащих фрагментированную ДНК, в норме не должна была превышать 20%; уровень анеуплоидии в сперме в норме составляет не более 1,3% [22].

В группе 1 выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и количеством бластоцист высокого качества ($r_s = -0,59$, $p < 0,01$). Средний возраст мужчин в группе 1 составил $35,4 \pm 4,8$ лет. Значимой корреляции между индексом ЧФБ и возрастом пациентов в данной экспериментальной группе ($r_s = 0,12$, $p > 0,05$) не обнаружено. Однако учитывая полученные нами ранее данные, в группе 1 были выделены две возрастные подгруппы [23]. В подгруппе мужчин младше 35 лет ($n=15$) средний возраст пациентов составил $30,6 \pm 2,3$ года. В подгруппе мужчин старше 35 лет ($n=15$) средний возраст пациентов – $40,3 \pm 3,2$ года. В этих подгруппах

выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между уровнем фрагментации ДНК спермы и долей бластоцист высокого качества от общего числа эмбрионов, достигших стадии бластоцисты ($r_s = -0,72$, $p < 0,01$; $r_s = -0,57$, $p < 0,05$, соответственно). Кроме того, в подгруппе мужчин старше 35 лет выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между уровнем фрагментации ДНК спермы и количеством полученных бластоцист высокого качества ($r_s = -0,56$, $p < 0,05$). Полученные данные представлены в табл. 1.

Средний возраст пациентов в группе 2 составил $37,2 \pm 4,5$ лет. Для мужчин группы 2 влияние возраста на процесс формирования бластоцист не установлено ($r_s = 0,01$, $R_{критич} = 0,29$, $N=49$, $p > 0,05$). Тем не менее, в этой группе мы также выделили две подгруппы с учетом возраста пациентов [24]. В подгруппе мужчин младше 35 лет ($n=21$) средний возраст составил $32,5 \pm 2,2$ лет. В подгруппе мужчин старше 35 лет ($n=28$) средний возраст – $40,8 \pm 4,4$ лет. Полученные данные о связи индекса ЧФБ и уровня анеуплоидий в сперме представлены в табл. 2.

В результате проведенного исследования в общей экспериментальной группе 2 показана отрицательная корреляция между уровнем анеуплоидий хромосомы 13 в сперме и количеством бластоцист морфологически высокого качества среди эмбрионов, полученных при проведении программы ЭКО ($r_s = -0,57$, $p < 0,01$). Для группы мужчин младше 35 лет выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между общим индексом ЧФБ и уровнем анеуплоидий хро-



а



б

Рис. Бластоцисты высокого и низкого морфологического качества: а – бластоцисты высокого морфологического качества; б – бластоциста низкого морфологического качества

Таблица 1

Зависимость индекса ЧФБ от уровня фрагментации ДНК сперматозоидов

Группа	Индекс частоты формирования бластоцист, %		Уровень фрагментации ДНК, %	r_s	$R_{критич}$	p	
Общая группа, N=30	Общее количество бластоцист, $\pm s_x$		46,0 \pm 13,4	19,0 \pm 6,0	-0,02	0,36	p>0,05
	Бластоцисты высокого качества	N \pm s _N	31,1 \pm 10,2	19,0 \pm 6,0	-0,59	0,47	p<0,01
		% \pm s _%	67,9 \pm 21,0	19,0 \pm 6,0	-0,70	0,47	p<0,01
Мужчины младше 35 лет, N=15	Общее количество бластоцист, $\pm s_x$		42,2 \pm 15,9	21,9 \pm 8,0	-0,14	0,52	p>0,05
	Бластоцисты высокого качества	N \pm s _N	26,6 \pm 11,9	21,9 \pm 8,0	-0,51	0,52	p>0,05
		% \pm s _%	60,4 \pm 22,2	21,9 \pm 8,0	-0,72	0,66	p<0,01
Мужчины старше 35 лет, N=15	Общее количество бластоцист, $\pm s_x$		49,7 \pm 10,4	16,1 \pm 3,7	0,17	0,52	p>0,05
	Бластоцисты высокого качества	N \pm s _N	35,6 \pm 8,7	16,1 \pm 3,7	-0,56	0,52	p<0,05
		% \pm s _%	75,4 \pm 16,6	16,1 \pm 3,7	-0,57	0,52	p<0,05

Примечания: N – число пациентов в группе, p – уровень значимости, r_s – коэффициент корреляции Спирмена.

Таблица 2

Зависимость индекса ЧФБ от уровня анеуплоидий в сперме

Группа	Количество бластоцист, $\bar{s} \pm s_x$	Хромосома	Индекс частоты формирования бластоцист, %	r_s	$R_{критич}$	N	p
Общая группа	Общее количество бластоцист	13	49,0 \pm 15,2	-0,21	0,29	46	p>0,05
		16	50,5 \pm 14,9	-0,14	0,32	38	p>0,05
		18	49,0 \pm 15,4	-0,11	0,29	49	p>0,05
		21	49,0 \pm 15,4	0,23	0,29	49	p>0,05
		X, Y	49,0 \pm 15,4	-0,06	0,29	49	p>0,05
	Бластоцисты высокого качества	13	31,8 \pm 11,7	-0,57	0,37	46	p<0,01
		16	31,5 \pm 12,0	-0,15	0,32	38	p>0,05
		18	31,6 \pm 12,1	-0,05	0,29	49	p>0,05
		21	31,6 \pm 12,1	0,24	0,29	49	p>0,05
		X, Y	31,6 \pm 12,1	0,08	0,29	49	p>0,05
Мужчины младше 35 лет	Общее количество бластоцист	13	46,2 \pm 14,1	-0,32	0,47	18	p>0,05
		16	45,7 \pm 12,6	0,10	0,5	16	p>0,05
		18	46,6 \pm 14,9	-0,57	0,56	21	p<0,01
		21	46,6 \pm 14,9	0,19	0,44	21	p>0,05
		X, Y	46,6 \pm 14,9	-0,27	0,44	21	p>0,05
	Бластоцисты высокого качества	13	29,9 \pm 12,4	-0,50	0,47	18	p<0,05
		16	29,5 \pm 12,9	0,05	0,50	16	p>0,05
		18	29,8 \pm 13,3	-0,46	0,44	21	p<0,05
		21	29,8 \pm 13,3	0,18	0,44	21	p>0,05
		X, Y	29,8 \pm 13,3	-0,04	0,44	21	p>0,05
Мужчины старше 35 лет	Общее количество бластоцист	13	50,8 \pm 15,6	-0,17	0,38	28	p>0,05
		16	54,1 \pm 16,1	-0,36	0,43	22	p>0,05
		18	50,8 \pm 15,6	0,23	0,38	28	p>0,05
		21	50,8 \pm 15,6	0,33	0,38	28	p>0,05
		X, Y	50,8 \pm 15,6	0,13	0,38	28	p>0,05
	Бластоцисты высокого качества	13	33,0 \pm 10,8	-0,62	0,48	28	p<0,01
		16	32,8 \pm 10,9	0,32	0,43	22	p>0,05
		18	33,0 \pm 10,8	0,28	0,38	28	p>0,05
		21	33,0 \pm 10,8	0,36	0,38	28	p>0,05
		X, Y	33,0 \pm 10,8	0,17	0,38	28	p>0,05

Примечания: p – уровень значимости, r_s – коэффициент корреляции Спирмена.

мосомы 18 в сперме ($r_s = -0,50$, $p < 0,01$), а также отрицательная корреляция между количеством blastocист морфологически высокого качества и уровнем анеуплоидий в сперме для хромосом 13 и 18 ($r_s = -0,50$, $p < 0,05$; $r_s = -0,46$, $p < 0,05$, соответственно). В группе мужчин старше 35 лет установлена статистически значимая отрицательная корреляция между уровнем анеуплоидий хромосомы 13 и количеством blastocист морфологически высокого качества ($r_s = -0,62$, $p < 0,01$).

Полученные нами данные подтверждают проведенные ранее другими авторами результаты исследований влияния анеуплоидий в сперме у мужчин с выраженной патоспермией на развитие и имплантацию эмбрионов при лечении бесплодия методами ВРТ [25]. Показана также связь между уровнем анеуплоидий в мужских гаметах и качеством ранних эмбрионов. В работах ряда авторов показатели снижения качества эмбрионов коррелируют с высоким уровнем анеуплоидий половых хромосом и хромосомы 18 в сперме [26, 27]. Высокий уровень хромосомных нарушений в сперме может быть показанием к проведению преимплантационной генетической диагностики для пациентов со сниженной репро-

дуктивной функцией при лечении бесплодия методами ВРТ [28].

Выводы

Выявлена связь между показателями уровня фрагментации ДНК спермы и особенностями раннего развития эмбрионов, полученных с помощью методов ВРТ. Показана статистически значимая отрицательная корреляция между уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов мужчин и количеством blastocист высокого качества в восточно-украинской популяции ($r_s = -0,59$, $p < 0,01$). Высокая частота анеуплоидий в ядрах сперматозоидов также является одной из причин ухудшения качества эмбрионов и снижения частоты формирования blastocист. Показана отрицательная корреляция между уровнем анеуплоидий хромосомы 13 в сперме и количеством blastocист морфологически высокого качества среди эмбрионов, полученных при проведении программы ЭКО ($r_s = -0,57$, $p < 0,01$). Оценка качества спермы мужчин со сниженной репродуктивной функцией должна являться необходимым мероприятием перед проведением программ ЭКО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долгов В.В., Луговская С.А., Фанченко Н.Д. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. – М.: Триада, 2006. – 145 с.
2. Dohle G.R., Diemer T., Giwercm A., Jungwirth A., Kopa Z., Krausz C. Мужское бесплодие (научное редактирование: Аюпян А.С.). – Европейская ассоциация урологов. – 2010. – 67 с.
3. Calle J.F., Muller A., Walschaerts M., Clavere J.L., Jimenez C., Wittemer C., Thonneau P. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study // *Fertility and Sterility*. – 2008. – 19, № 6. – P. 671–682.
4. Simon L., Brunborg G., Stevenson M., Lutton D., McManus J., Lewis S.E.M. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome // *Hum Reprod*. – 2010. – 25, № 7. – P. 1594–1608.
5. Speyer B.E., Pizzey A.R., Ranieri M., Joshi R., Delhanty J.D.A., Serhal P. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation // *Hum Reprod*. – 2012. – 25, № 7. – P. 1609–1618.
6. Bronet F., Martnez E., Gaytam M., Lin`arn A., Cernuda D., Ariza M., Nogales M. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients // *Hum Reprod*. – 2012. – 27, № 7. – P. 1922–1929.
7. Oleszczuk K., Giwercman A., Bungum M. Intra-individual variation of the sperm chromatin structure assay DNA fragmentation index in men from infertile couples // *Hum Reprod*. – 2011. – 26, № 12. – P. 3244–3248.
8. El-Sayed A. Mohamed, Myung-Geol Pang Sperm Aneuploidy and Male Fertility // *Aneuploidy: Etiology, Disorders and Risk Factors*. – 2012. – Chapter IX. – P. 144–159.
9. Ramasamy R., Scovell J.M., Kovac J.R., Cook P.J., Lamb D.J., Lipshultz L.I. Fluorescence *in situ* hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss // *Fertility and Sterility*. – 2015. – 103, № 4. – P. 906–909.
10. Чапля О.В. Особливості доімплантаційного розвитку культивованих *in vitro* ембріонів людини із кількісними хромосомними аномаліями: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.11. – К., 2014. – 20 с.
11. Пилип Л.Я. Особливості мейотичної сегрегації транслокацій у сперматозоїдах чоловіків із безпліддям: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.15. – К., 2015. – 20 с.
12. Гонтар Ю.В. Цитогенетичні характеристики різних онтогенетичних етапів людини у рамках ДРТ: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.15. – К., 2016. – 28 с.
13. Ni W., Xiao S., Qiu X., Jin J., Pan C., Li Y., Fei Q., Yang X., Zhang L., Huang X. Effect of Sperm DNA Fragmentation on Clinical Outcome of Frozen-Thawed Embryo Transfer and on Blastocyst Formation / *PLoS ONE*. – 2014. – 9, № 4. – P. 1.
14. Ebner T., Moser M., Sommergruber M., Feichtinger O., Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients // *Human Reprod*. – 2002. – 17, № 8. – P. 2415–2418.
15. Fisch J.D., Rodriguez H., Ross R., Overby G., Sher J. The graduated embryo score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage – stage embryos // *Hum Reprod*. – 2001. – 16, № 9. – P. 1970–1975.

16. Burruel V., Klooster K., Barker C.M., Pera R.R., Meyers S. Abnormal Early Cleavage Events Predict Early Embryo Demise: Sperm Oxidative Stress and Early Abnormal Cleavage / Scientific Reports. – 2014. – № 4. Doi: 10.1038/srep0659.
17. Komiya A., Kato T., Kawauchi Y., Watanabe A. Clinical Factors Associated with Sperm DNA Fragmentation in Male Patients with Infertility / The Sci. World J. – 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/868303>.
18. Brahem S., Mehdi M., Elghezal H., Saad A. Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated Teratozoospermia // J Assist Reprod Genet. – 2011. – № 28. – P. 41–48.
19. Mehdi M. Analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) of the relationship between gonosomic aneuploidy and the results of assisted reproduction in men with severe oligozoospermia // Andrologia. – 2006. – 38, № 4. – P. 137–141.
20. Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології: підруч. для студентів біолог. спец. вищих навч. закладів. – Х.: [б. в.], 2007. – 286 с.
21. Левиашвили М.М., Мишиева Н.Г., Костромина Н.Ю., Назаренко Т.А. Оценка морфологии преимплантационных эмбрионов на различных стадиях in vitro (обзор литературы) // Проблемы репродукции. – 2011. – № 3. – С. 74–79.
22. Dohle G.R., Diemer T., Kora Z. European Association of Urology Working Group on Male Infertility [Электронный ресурс]. – Eur Urol, 2014. – Режим доступа: [http://uroweb.org/wp-content/uploads/17-Male Infertility_LR.pdf](http://uroweb.org/wp-content/uploads/17-Male%20Infertility_LR.pdf)
23. Zhylkova I., Feskov O., Feskova I., Fedota O., Feskov V. Sperm DNA Fragmentation as a Factor of Male Low Reproductive Function in IVF Practice // International Journal of Biology. – 2014. – 6, № 1. – P. 75–81.
24. Феськов А.М., Жилкова Е.С., Сотник Н.Н., Федота А.М. Исследование связи между нарушением компактизации хроматина и наличием анеуплоидий в ядрах сперматозоидов у мужчин со сниженной фертильностью // Вестник ХНУ им. В.Н. Каразина. Серия: Биология. – 2013. – Вып. 17, № 1056. – С. 92–98.
25. Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P. Sperm and Blastomere Aneuploidy Detection in Reproductive Genetics and Medicine // J Histochem Cytochem. – 2005. – 53, № 3. – P. 261–267.
26. Nicopoullos J.D., Gilling-Smith C., Almeida P.A., Homa S., Nice L., Tempest H., Ramsay J.W. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? // Hum. Reprod. – 2008. – 23, № 2. – P. 240–250.
27. Rodrigo L., Peinado V., Mateu E., Remohi J., Pellicer A., Simon C., Gil-Salom M., Rubio C. Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos // Fertil. Steril. – 2010. – 94, № 4. – P. 1380–1386.
28. Долгушина Н.В. Риск анеуплоидии эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий у мужчин с патозооспермией (мета-анализ) // Акушерство и гинекология. – 2012. – № 7. – С. 4–13.

ZHYLKOVA I.S.^{1,2}, CHUMAKOVA N.O.¹, TISCHENKO O.O.¹, FESKOV O.M.¹, FEDOTA O.M.²

¹ Center of Human Reproduction «Clinic of Professor Feskov O.M.»,
Ukraine, 61098, Kharkiv, Yelizarova str., 15, e-mail: zhilkova@mail.ru

² Karazin's Kharkiv National University,
Ukraine, 61000, Kharkiv, Svobody Square, 4

ANALYSIS OF CORRELATION OF DNA FRAGMENTATION AND ANEUPLOIDY IN SPERM WITH PARAMETERS OF EARLY EMBRYOS

Aim. The dependence of the process of blastocyst formation in IVF practice on the level of sperm DNA fragmentation and sperm aneuploidies in men with low reproductive function was studied. **Methods.** The level of the sperm DNA fragmentation was measured by the method of sperm chromatin dispersion. Semen aneuploidies were detected by the method of fluorescence in situ hybridization. **Results.** The significant negative correlation between DNA fragmentation level and formation of the high quality blastocyst is proved. There is a negative correlation between the level sperm aneuploidies and number and quality of formatted blastocysts. **Conclusions.** The failures of sperm DNA compactization influence the early embryo development. There is a dependence of blastocyst formation rates on the level of sperm aneuploidy.

Keywords: DNA fragmentation, sperm aneuploidy, blastocyst formation rates.