

DOI: 10.31082/1728-452X-2018-194-8-45-48  
УДК 577.21-576.316/616.69-008.6

## ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ АНЕУПЛОИДИЙ В СПЕРМАТОЗОИДАХ ПАЦИЕНТОВ С ПАТОЗООСПЕРМИЕЙ

А.Т. АМАНОВ, Л.Н. ТУЛЕЕВА, М.А. МАКАЖАНОВ, М.Т. БАТЫРБЕКОВ, Г.Б. ДАКЕНОВА

Научный центр урологии им. Б.У. Джарбусынова, г. Алматы, Республика Казахстан

Анеуплоидия – состояние, при котором в клетке организма содержится аномальное количество хромосом и может быть причиной наследственных аномалий. При наличии различных видов патозооспермии зачастую увеличивается уровень анеуплоидии хромосом в сперматозоидах. Генетический фактор патозооспермии является одним из основных факторов снижения эффективности ВРТ у бесплодных супружеских пар.

**Целью наших исследований** явилась оценка роли генетического фактора при патозооспермии.

**Материал и методы.** У пациентов по заключению спермограммы патозооспермия и нормозооспермия проводили анализ на наличие хромосомных аномалий в ядрах сперматозоидов по X, Y, 13, 18 и 21 хромосомам методом флуоресцентной гибридизации in situ с использованием флуоресцентных ДНК-зондов (Vysis Multi Vysion PGT, Abbot Molecular).

**Результаты и обсуждение.** Исследование сперматозоидов методом FISH показало, что у пациентов с НЗ количество клеток с патологическим сигналом половых хромосом не превышало допустимых величин, тогда как уровень числовых хромосомных аббераций при ОАТЗС был выше такового при НЗ в 2 раза, при АТЗС на 32% и при АЗС в 2,5 раза. В группе пациентов с нормозооспермией суммарное число аутосом с отклонениями в количестве не превышало установленных значений, тогда как у больных с ОАТЗС уровень анеуплоидий превысил показатели нормы практически в 3 раза, при АТЗС данное значение было выше в 4,3 раза относительно контроля, при АЗС больше в 7,2 раза. Оценка степени сегрегации по 13, 18 и 21 аутосомам показала, что в случае патозооспермии частота нерасхождения данных пар соматических хромосом превышает таковое у пациентов с НЗ.

**Выводы.** Исследование суммарной частоты количественных аутосомных аббераций в сперматозоидах показало, что у лиц с НЗ соотношение нормальных клеток и аномальных гамет не превышало допустимых величин (<2%) средний уровень анеуплоидий у пациентов с ОАТЗС и АТЗС был выше в 2 раза, тем не менее не превышал допустимых значений. В результате анализа числа соматических хромосом в ядрах сперматозоидов выявлены значительные аномалии набора у пациентов, диагностированных как лица с АЗС.

**Ключевые слова:** патозооспермия, анеуплоидии, метод флуоресцентной гибридизации in situ, нуллисомия.

**Для цитирования:** Аманов А.Т., Тулеева Л.Н., Макажанов М.А., Батырбеков М.Т., Дакенова Г.Б. Исследование уровня анеуплоидий в сперматозоидах пациентов с патозооспермией // Медицина (Алматы). – 2018. - №8 (194). – С. 45-48

### Т Ы Ж Ы Р Ы М

#### ПАТОЗООСПЕРМИЯ ҚОРЫТЫНДЫСЫ БАР НАУҚАСТАРДЫҢ СПЕРМАТОЗОИД АНЕУПЛОИДИЯСЫН ЗЕРТТЕУ

А.Т. АМАНОВ, Л.Н. ТӨЛЕЕВА, М.А. МАҚАЖАНОВ, М.Т. БАТЫРБЕКОВ, Г.Б. ДӘКЕНОВА

Б.У. Жарбосынов атындағы урология ғылыми орталығы, Алматы қ.,  
Қазақстан Республикасы

Анеуплоидия – ағза клеткаларындағы хромосомдар жиынтығы қалыпты болмайтын жағдай, ол тұқым қуалайтын ауытқулардың себебі болады. Патозооспермияның түрлі формалары орын алған кезде сперматозоидтардағы хромосомалардың анеуплоидия дәрежесінің жоғарылау ықтималдығы зор. Патозооспермияның генетикалық факторы баласыз жұптарға жасалатын ҚРТ нәтижелілігін төмендетуші факторлардың бірі.

**Зерттеудің мақсаты.** Патозооспермия кезіндегі генетикалық факторлардың ролін анықтау.

**Материал және әдістері.** Спермограмма қорытындысы нормозооспермия және патозооспермия деп қойылған адамдардың аталық жыныс клеткаларының ядроларында X, Y, 13, 18 және 21 хромосомалар бойынша ақаулардың бар-жоғы флуоресцентті ДНК-зондтар көмегімен (Vysis Multi Vysion PGT, Abbot Molecular) in situ флуоресцентті гибридизация әдісі арқылы зерттелді.

**Нәтижелері және талқылауы.** FISH әдісімен сперматозоидтарды зерттеу нәтижесінде, НЗ жағдайында жыныс хромосомаларында патологиялық белгісі бар клеткалар саны рұқсат етілген мөлшерден аспады, ал ОАТЗС диагнозы қойылған науқастардың үлгілерінде сандық хромосомалық абберациялар деңгейі 2 есе, АТЗС кезінде 32% және АЗС жағдайда 2,5 есе жоғары болды. Сол сияқты аутосомалардағы сандық хромосомалық ауытқулар көрсеткіші қалыпты жағдайдан ОАТЗС кезінде 3 есе, АТЗС – 4,3 есе, АЗС 7,2 есе артқан.

**Қорытынды.** Анеуплоидиялар жиілігінің жалпы көрсеткіші НЗ тобында рұқсат етілген шамадан артпаған болды. ОАТЗС пен АТЗС сырқаттардың анеуплоидия дәрежесі одан 2 есе жоға-

**Контакты:** Аманов Ануар  
Турсунжанович, д-р мед. наук,  
председатель Правления АО  
"Научный Центр урологии им.  
Б.У. Джарбусынова", г. Алматы,  
ул. Басенова, 2.  
E-mail: info@urolog.kz

**Contacts:** Anuar T Amanov,  
MD, General director of  
Research center of Urology a.n.  
B.U. Dzarbussynov, Almaty c.,  
Basenova str., 2.  
E-mail: info@urolog.kz

Принято 06.08.2018

ры болғанымен, олардың шамалары қалыпты шамадан ауытқымаған. АЗС диагнозы қойылған науқастарда сперматозоидтардың ядроларында аутосомалардың санында елеулі ауытқулар болғандығы анықталды.

**Негізгі сөздер:** патозооспермия, анеуплодия, in situ флуоресцентті гибридизация әдісі, нуллисомия.

## SUMMARY

### THE STUDY OF THE LEVEL OF ANEUPLOIDY IN SPERMATOOZOA OF PATIENTS WITH PATHOOZOSPERMIA

AT AMANOV, LN TULEYEVA, MA MAKAZHANOV, MT BATYRBEKOV, GB DAKENOVA  
Research Centre of Urology n.a. B.U. Dzarbussynov, Almaty c., Republic of Kazakhstan

Aneuploidy is a condition in which an anomalous amount of chromosomes is contained in the body cell. Aneuploidy occurs as a result of a violation of segregation of chromosomes in mitosis or meiosis, and may be the cause of hereditary anomalies. In the presence of various types of pathozoospermia (oligozoospermia - OZS, astenozoospermia - AZS, teratozoospermia - TZS) the level of aneuploidy of chromosomes in spermatozoa increases. The genetic factor of pathozoospermia is one of the main factors in reducing the effectiveness of ART in infertile couples.

**The purpose of our studies** was to evaluate the role of the genetic factor in pathozoospermia.

**Material and methods.** In patients with the conclusion of the spermogram of pathozoospermia and normozoospermia, further analysis was carried out for the presence of chromosomal abnormalities in the sperm nuclei for X, Y, 13, 18 and 21 chromosomes by fluorescence in situ hybridization using fluorescent DNA probes (Vysis Multi Vysion PGT, Abbot Molecular).

**Results and discussion.** The study of spermatozoa by the FISH method showed that in patients with NS the number of cells with a pathological signal of sex chromosomes associated with their segregation did not exceed the permissible values, while the level of numerical chromosomal aberrations at OATZS exceeded that for NZ in 2 times, with ATZS by 32% and at the AZS station 2.5 times. The total number of autosomes with abnormalities characteristic for quantitative chromosomal aberrations in the group of patients with normozoospermia did not exceed the established values, whereas in patients with OATZS the level of aneuploidy exceeded the normal values by almost 3 times, with ATZS this value was higher by almost 4.3 times with respect to control, with filling stations more than 7.2 times. An estimate of the degree of segregation of 13, 18, and 21 autosomes showed that in the case of pathozoospermia, the incidence of non-divergence of these pairs of somatic chromosomes exceeds this value of patients with NZ.

**Conclusions.** Investigation of the total frequency of quantitative autosomal aberrations in gametes showed that in individuals with NZ the ratio of normal cells to gametes with an additional signal of chromosomes did not exceed the permissible values (<2%), the average level of aneuploidy in patients with OATZS and ATZS was twice higher ( $p = 0.042$  and  $p = 0.038$ ), however, did not exceed the allowable values. As a result of the analysis of the number of somatic chromosomes in sperm nuclei, significant anomalies in patients diagnosed as persons with aAZS station were revealed.

**Keywords:** pathozoospermia, aneuploidy, fluorescence in situ hybridization method, nullisomia.

**For reference:** Amanov AT, Tuleyeva LN, Makazhanov MA, Batyrbekov MT, Dakenova GB. The study of the level of aneuploidy in spermatozoa of patients with pathozoospermia. *Meditsina (Almaty) = Medicine (Almaty)*. 2018;8(194):45-48 (In Russ.). DOI: 10.31082/1728-452X-2018-194-8-45-48

**А**неуплоидия - это генетическое нарушение, при котором в клетке организма содержится аномальное количество хромосом, приводящих к проявлению некоторых наследственных синдромов у человека, также сопровождаются спонтанными абортми, мертворождениями и различными дефектами развития. Повышенная частота анеуплоидии также связана с мужским бесплодием [1]. В ряде исследований было выявлено, что при наличии различных видов патозооспермии увеличивается уровень анеуплоидии хромосом в сперматозоидах. Также большинство данных указывают на то, что возраст также влияет на увеличение анеуплоидии [2]. В результате оплодотворения яйцеклетки генетически неполноценным сперматозоидом высока вероятность образования анеуплоидного эмбриона [3].

Приблизительно 30-50% случаев ранних доимплантационных потерь около 30% случаев спонтанных абортов

в течение первого триместра беременности и 6% случаев мертворождений или случаев младенческой смертности обусловлены наличием хромосомных аномалий в клетках эмбриона [4]. Генетический фактор патозооспермии является одним из основных факторов снижения эффективности ВРТ у бесплодных супружеских пар. Данное обстоятельство указывает на необходимость исследования хромосомного набора зрелых мужских гамет при различных формах патозооспермии [5].

**Целью наших исследований** явилась оценка влияния генетического фактора на развитие патозооспермии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе работы было проведено исследование 54 образцов спермы. Возраст обследованных пациентов варьировал от 24 до 44 лет и в среднем составил  $30,1 \pm 3,9$  года. У пациентов по заключению спермограммы патозоо-

спермия и нормозооспермия проводили анализ на наличие хромосомных аномалий в ядрах сперматозоидов по X, Y, 13, 18 и 21 хромосомам методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием флуоресцентных ДНК-зондов (Vysis Multi Vysion PGT, Abbot Molecular). Оценку проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope 40.

**Статистическая обработка данных** проводилась с учетом Т-критерия Стьюдента для независимых выборок при помощи программы GraphPad Prism 6.0 (GraphPadSoftWare, SanDiego, CA). Результаты считались достоверными при значении  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа спермограммы у 22 пациентов обнаружена ОАТЗС, у 17 – АТЗС, у 10 – АЗС и у 5 человек отклонений не выявлено.

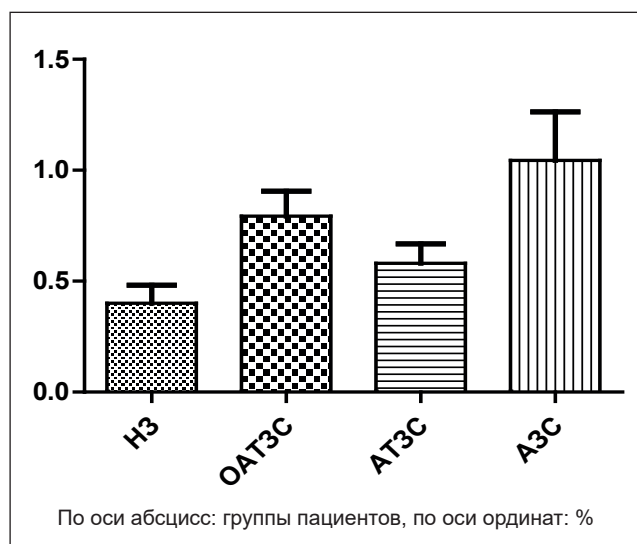


Рисунок 1 – Уровень анеуплоидий в половых хромосомах

Исследование сперматозоидов методом FISH показало, что у пациентов с НЗ количество клеток с патологическим сигналом половых хромосом, связанных с их сегрегацией, не превышало допустимых величин ( $< 2\%$ ) и составило  $0,4\% \pm 0,08$ , при ОАТЗС  $0,79 \pm 0,11$ , при АТЗС  $0,58 \pm 0,11$ , при АЗС  $1,045 \pm 0,22$ . Таким образом, уровень числовых хромосомных aberrаций при ОАТЗС превышал таковой при НЗ в 2 раза, при АТЗС на 32% и при АЗС в 2,5 раза (рис. 1).

Процент сперматозоидов с нуллисомией в отношении гоносом составил при ОАТЗС - 0,07, АТЗС - 0,13 и АЗС - 0,38, тогда как у пациентов с НЗ нуллисомии сперматозоидов не имели места. Остальная доля анеуплоидий приходится на такие варианты как дисомии XX, XY и YY.

Исследование суммарного уровня анеуплоидий по аутосомам выявило, что суммарное количество аутосом с отклонениями, характерными для количественных хромосомных aberrаций в группе пациентов с нормозооспермией, составили  $0,25 \pm 0,03$ , что не превышает

установленных значений, тогда как у больных с ОАТЗС уровень анеуплоидий превысил нормальные значения практически в 3 раза ( $p = 0,00019$ ), при АТЗС данное значение было выше практически в 4,3 раза ( $p = 0,003$ ) относительно контроля, при АЗС больше в 7,2 раза ( $p < 0,0001$ ). В качестве референсных значений частот встречаемости сперматозоидов с анеуплоидией по хромосомам 13, 18, 21 были приняты значения частот сперматозоидов с анеуплоидией, полученные для здоровых мужчин с нормозооспермией и нормальным мужским кариотипом. Оценка степени сегрегации по 13 аутосоме показала, что в случае ОАТЗС частота нерасхождения 13 пары соматических хромосом превышает данное значение пациентов с НЗ в 4,5 раза ( $p = 0,0018$ ), в случае АТЗС в 5 раз ( $p = 0,0012$ ) и в случае АЗС в 12 раз ( $p = 0,0001$ ). Исследование частоты нерасхождения 18 и 21 пары хромосом показали аналогичную тенденцию. Частота случаев сегрегации 18 пары хромосом при НЗ составила  $0,24 \pm 0,02$  и 21 пары -  $0,31 \pm 0,04$ , при ОАТЗС отмечено повышение доли хромосом с названными aberrациями в 2 и 2,4 раза ( $p = 0,04$  и  $P = 0,025$ ) соответственно, при АТЗС процент сегрегированных аутосом составляет  $0,72 \pm 0,16$  ( $p = 0,0002$ ) и  $1,09 \pm 0,22$  ( $p = 0,0004$ ), что выше нормы практически в 3 раза. У лиц с диагностированной АЗС частота анеуплоидий 18 и 21 аутосом превышала данный показатель контрольной группы в 4,2 и 6 раз соответственно ( $p < 0,0001$ ).

## ВЫВОДЫ

Исследование суммарной частоты количественных аутосомных aberrаций в гаметах показало, что у лиц с НЗ соотношение нормальных клеток и аномальных гамет не превышало допустимых величин. Средний уровень анеуплоидий у пациентов с ОАТЗС и АТЗС был выше в 2 раза ( $p = 0,042$  и  $p = 0,038$ ), однако не превышал допустимых значений.

В результате анализа числа соматических хромосом в ядрах сперматозоидов выявлены значительные аномалии набора у пациентов, диагностированных как лица с АЗС: суммарный уровень анеуплоидий составил  $2,6\% \pm 0,6$  ( $p = 0,0002$ ). Таким образом, можно сделать предположение о том, что механизм бесплодия у обследованных пациентов с диагнозами ОАТЗС и АТЗС мало связан с количественными нарушениями кариотипа, тогда как в случае с АЗС генетический фактор нарушения сперматогенеза имеет место.

## Прозрачность исследования

*Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.*

## Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

*Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получили гонорар за статью.*

## Конфликт интересов

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 You Y.A., Park Y.J, Kwon W.S., Yoon S.J., Ryu B.Y., Kim Y.J., Pang M.G. Increased frequency of aneuploidy in long-lived spermatozoa // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9:e114600. DOI: 10.1371
- 2 Алчинбаев М.К., Макажанов М.А., Тулеева Л.Н. Уровень анеуплоидий в ядрах сперматозоидов у пациентов с infertility в браке // *Вестник урологии*. – 2016. - №2. – С. 5-12
- 3 Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. – СПб.: Н-Л, 2007. – С. 78-79
- 4 Gardner R.J.M., Sutherland H.R. Chromosome abnormalities and genetic counseling // *Oxford Monographs on Medical Genetics*. – 2004. – Vol. 16. – P. 79–80
- 5 Гонтарь Ю.В., Ильин И.Е., Бударцакая Н.А., Связь количественных хромосомных аномалий сперматозоидов и преимплантационных эмбрионов // *Живые и биокосные системы*. - 2014. - №8. URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-8/article-11>

## REFERENCES

- 1 You YA, Park YJ, Kwon WS, Yoon SJ, Ryu BY, Kim YJ, Pang MG. Increased frequency of aneuploidy in long-lived spermatozoa. *PLoS One*. 2014;9:e114600. DOI: 10.1371
- 2 Alchinbaev MK, Makazhanov MA, Tuleyeva LN. The level of aneuploidy in the nuclei of spermatozoa in patients with infertility in marriage. *Vestnik urologii = Bulletin of urology*. 2016;2:5-12 (In Russ.)
- 3 Baranov VS, Kuznetsova TV. *Citogenetika embrionalnogo razvitya cheloveka* [Cytogenetics of human embryonic development]. St. Petersburg: N-L; 2007:78-9 ( In Russ)
- 4 Gardner RJM, Sutherland GR. chromosomal disorders and genetic counseling. *Oxford monographs on medical genetics*. 2004;16:79-80
- 5 Gontar JV, Ilyin IE, Bodaretska N. Relationship of quantitative chromosomal abnormalities of spermatozoa and preimplantation embryos. *Zhivaya i bioinealnaya Sistema = Live and biocose systems*. (In Russ). 2014;8. URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue>