

© И. Д. Федорова¹,
Е. М. Шильникова^{1,2}, А. М. Гзгзян¹

¹ ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта»
СЗО РАМН

² Санкт-Петербургский государственный
университет

ПРИНЦИПЫ ОТБОРА СПЕРМАТОЗОИДОВ ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ, БИОХИМИЧЕСКИМ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ ПРИЗНАКАМ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ВНУТРИЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ИНЪЕКЦИИ СПЕРМАТОЗОИДОВ В ООЦИТ

УДК: 612.616.2-07:618.177-089.888.11

■ Описаны принципы отбора единичных сперматозоидов для оплодотворения, представлены данные литературы о взаимосвязи между морфофункциональными и биохимическими параметрами мужских половых клеток и структурно-функциональными особенностями организации их генома.

■ **Ключевые слова:** вспомогательные репродуктивные технологии; ИКСИ морфологическая форма сперматозоида; хромосомный комплемент; целостность ДНК.

Список сокращений

мтДНК — митохондриальная ДНК

Словарь

ИМСИ (IMSI — motile sperm organellar morphology examination) ИКСИ с морфологическим отбором сперматозоидов.

ПИКСИ (PICSI) — (physiologic ICSI) — ICSI с использованием гиалуроновой кислоты.

FISH — fluorescent in situ hybridization — флуоресцентная гибридизация *in situ*.

Введение

Активное развитие вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) помогает преодолевать различные формы нарушения женской и мужской репродуктивной функции. Основные методы ВРТ, включающие в себя инвазивные процедуры, предусматривают стимуляцию овуляции и оплодотворение *in vitro*. Но, если количество получаемых ооцитов оценивается единицами, то в одной порции эякулята может содержаться до нескольких десятков миллионов сперматозоидов. Даже при значительной олигозооспермии (снижение концентрации сперматозоидов в эякуляте) и криптозооспермии (единичные сперматозоиды в эякуляте) количество доступных для оплодотворения сперматозоидов значительно превышает количество получаемых яйцеклеток. Таким образом, возникает закономерный вопрос о необходимости отбора сперматозоидов, методах и принципах селекции.

Предложенный в 1992 году в Бельгии профессором Ван Штертейгем (Van Steirteghem) метод ИКСИ (внутрицитоплазматической инъекции сперматозоидов в ооцит — ICSI) позволил преодолевать определенные формы мужского бесплодия, связанные со значительным снижением концентрации, подвижности и определенными формами тератозооспермии. Уже тысячи детей рождены после процедуры ИКСИ. Одни исследователи не обнаруживают каких-либо отличий в частоте выявления пороков развития у детей, рожденных после естественного зачатия или в результате процедуры ЭКО/ИКСИ [10, 78]. Другие утверждают, что у таких детей частота врожденных пороков повышена [44, 8]. Это скорее можно объяснить особенностями выборки. До недавнего времени ИКСИ применялся только при тяжелой форме мужского бесплодия, но не всегда учитывался тот факт, что в 10–15% случаев подобные патозоспермии (олигозооспермия, криптозооспермия) связаны с хромосомными aberrациями в кариотипе и мутациями некоторых генов, что может являться причиной врожденных аномалий у детей [1]. Тем острее стоит вопрос о возможности прижизненного отбора единичных сперматозоидов по внешним признакам и корреляции этих внешних

морфофункциональных параметров и таких показателей как хромосомный набор сперматозоида, целостность и зрелость его ДНК, а также его цитологические особенности. Возможно, только для определенных форм сперматозоидов характерны генетические и цитологические аномалии, которые могут приводить к нарушению оплодотворения, аномалиям развития эмбриона и рождению детей с тяжелыми пороками. В таком случае дальнейшие исследования следует направить на выявление таких форм сперматозоидов, чтобы предотвратить их участие в программах ИКСИ.

1. Отбор сперматозоидов по функциональным параметрам

Не смотря на то, что в циклах ИКСИ можно проводить инъекцию с использованием слабоподвижных и неподвижных сперматозоидов, предпочтение отдается сперматозоидам с нормальной скоростью и характером движения: прямолинейное, вращательное движение со скоростью 20–25 мкм/с.

При естественном зачатии оплодотворение происходит в фаллопиевой трубе и отбор сперматозоидов по подвижности происходит естественным образом — неподвижные и слабоподвижные сперматозоиды не способны к оплодотворению. Возникает вопрос: существует ли корреляция между особенностями движения сперматозоида и какими-либо генетическими, эпигенетическими и цитологическими параметрами.

Локомоторный аппарат сперматозоида организован аналогично всем ресничным аппаратам эукариот [73]. Нарушения центриоли, микротрубочек, денеиновых ручек и других структур локомоторного аппарата приводят к нарушению подвижности. Действительно, аномалии ресничного аппарата приводят к патологии дыхательных путей (носа, носовых пазух, бронхов), что является причиной синдромов Картагенера и Янга (Kartagener syndrome, OMIM 244400; Young syndrome, OMIM 279000). У таких пациентов отмечается также снижение фертильности вследствие нарушения подвижности сперматозоидов (астенозооспермия) [25, 38]. Аналогичная картина наблюдается при синдроме неподвижности ресничек [75]. Таким образом, можно говорить, что существует определенная взаимосвязь между способностью сперматозоида к движению и нарушениями некоторых генов. Однако подобные генетические дефекты подвергаются действию отбора и вероятность их передачи в следующее поколение в результате естественного зачатия снижена.

Следует отметить, что у человека, помимо центриоли яйцеклетки наследуется также и центриоль сперматозоида. Аномалии строения центриоли сперматозоида при оплодотворении могут приво-

дить к нарушению сингамии, блоку дробления, а также вызывать анеуплоидию и мозаицизм эмбриона за счет нарушения первых митотических делений [73]. Это дает основание предполагать, что не только неподвижность, но и различные нарушения характера и скорости движения сперматозоида, вызванные аномалиями центриоли и других структур хвоста, могут приводить к нарушению оплодотворения и развития эмбриона. Показано, что у пациентов, в сперматозоидах которых обнаружены аномалии структур центральной аксонемы, отмечалось снижение скорости делений дробления эмбрионов, полученных методом ИКСИ [24].

Подвижность сперматозоида обеспечивается также и митохондриями, спиралевидно располагающимися вокруг аксонемы и обеспечивающими энергетическую поддержку движения жгутика. Мутации в любом из генов, участвующих в синтезе АТФ, могут существенно повлиять на эффективность его синтеза и, как следствие, отразиться на подвижности сперматозоидов. На данный момент известно несколько мутаций и делеций генов мтДНК, приводящих к бесплодию у мужчин. [70, 66]. В некоторых случаях идиопатической астенозооспермии также обнаруживаются структурные дефекты митохондриальной мембраны [4]. Однако наследование митохондрий у человека происходит по женской линии и незначительное количество отцовских митохондрий не могут значительно повлиять на развитие эмбриона.

В настоящее время для основных манипуляций ВРТ используются единые методы отбора подвижных сперматозоидов: метод swim-up, основанный на способности сперматозоидов всплывать в более верхние слои питательной среды, и метод центрифугирования в градиенте плотности, основанный на способности живых сперматозоидов проходить сквозь градиент силиконовых частиц. При проведении процедуры ИКСИ выбор сперматозоидов по характеру и скорости движения происходит визуально и не представляет сложности даже при небольшом увеличении микроскопа и использовании поливинилпирролидона для замедления движения.

2. Отбор сперматозоидов по морфологическим характеристикам

Характерные морфологические признаки нормального сперматозоида: овальная головка длиной 4–6 мкм и шириной 2–4 мкм, акросома занимает 40–70% головки, отсутствие дефектов шейки и хвоста, цитоплазматическая капля не должна превышать по размеру головку [40, 79, 80]. В отличие от большинства млекопитающих, у человека регистрируется наибольший процент морфологически аномальных спермиев [47]. И за последние

годы этот параметр продолжает ухудшаться. В издании ВОЗ 2010 года по анализу эякулята норма по доле морфологически нормальных сперматозоидов снижена с 14 до 4% [79].

В настоящее время анализ генетического материала сперматозоидов проводится по двум основным параметрам: число и структура хромосом сперматозоида и функциональное состояние ДНК.

Численные нарушения кариотипа и несбалансированные структурные перестройки у человека приводят к остановке развития эмбриона на ранних стадиях, тяжелым врожденным аномалиям или бесплодию. Образование эмбрионов с несбалансированным хромосомным набором происходит достаточно часто. Так, до 15% беременностей, полученных естественным путем, останавливаются в развитии до 13 недели и в 60% случаев это вызвано нарушением кариотипа эмбриона [31, 29]. Описаны случаи полиплоидии и трисомии по всем хромосомам, кроме хромосом 1 и 19, что дает основание предполагать, что дисбаланс по генам, локализованным в этих хромосомах, нарушает доимплантационное развитие эмбриона или процесс имплантации [31]. Основной вклад в частоту анеуплоидии, обнаруживаемой в эмбрионах человека, вносится ооцитом, однако порядка 10% анеуплоидий по аутосомам и 50% анеуплоидий по гоносомам, а также большая часть структурных перестроек *de novo*, имеют отцовское происхождение [44, 30].

Успешное завершение развития эмбриона, по крайней мере, частично, зависит от целостности и зрелости ДНК сперматозоида. Имеются пороговые значения повреждений ДНК (к которым относятся фрагментация ДНК, нарушение компактной упаковки ДНК, дефицит протаминов), при которых отмечаются аномалии развития эмбрионов. В ряде исследований показано выраженное различие в содержании сперматозоидов с поврежденной ДНК между группами фертильных мужчин и пациентов с бесплодием [13]. Степень оплодотворения может быть близка к нулевой, если доля сперматозоидов с повреждением ДНК превышает 30%, как при естественном зачатии, так и при внутриматочной инсеминации [43, 13]. Также есть мнение, что фрагментация ДНК не снижает оплодотворяющей способности сперматозоида, а имеет более отдаленные последствия, снижая способность эмбриона к имплантации [74, 53, 42]. Показано, что вероятность спонтанного прерывания беременности при повышении индекса фрагментации ДНК увеличивается в 2,5 раза [64].

Исследования, касающиеся массового анализа сперматозоидов из эякулята пациентов с высоким содержанием морфологически аномальных сперматозоидов, указывают на повышение доли

гетероплоидии и доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК [16, 71]. Однако при ИКСИ такие данные малоинформативны. Очевидно, что при наличии в образце эякулята сперматозоидов с нормальной морфологией именно их следует отбирать для оплодотворения, но, если таких сперматозоидов нет, то возникает вопрос о приоритете выбора сперматозоида с той или иной патологией.

Основные части сперматозоида: головка, шейка и хвост. Очевидно, что наиболее важны морфологические особенности головки, содержащей ядро, несущее всю генетическую информацию, и акросому — органоид для проникновения сперматозоида в ооцит. Изменения формы головки сперматозоида различны и могут быть как изолированными, так и сочетанными. Однако они могут быть объединены в несколько групп.

2.1. Изменение линейных размеров головки сперматозоида.

Одним из наиболее распространенных морфологических изменений головки сперматозоида является пропорциональное изменение ее размеров. Размеры головки сперматозоида варьируют в широких пределах: от отсутствия головки, так называемая булавоносная головка, до экстремально большой головки — мегалоцефалическая. Логично предположить, что изменения количества генетической информации при гетероплоидии могут отражаться на объеме головки сперматозоида. Действительно, у пациентов с преимущественно макроцефалической формой головки методом FISH показано значительное увеличение доли полиплоидных и дисомных сперматозоидов [72]. Результаты наших собственных исследований по анализу кариотипа индивидуальных сперматозоидов также подтверждают это наблюдение [2], хотя некоторые авторы в аналогичных экспериментах не отмечали увеличения частоты гетероплоидии в сперматозоидах с увеличенной головкой [41].

Помимо этого, незначительное увеличение размеров головки сперматозоида может быть связано с нарушением этапов ремоделирования хроматина и его компактизации, что осуществляется в основном за счет замены гистоновых белков на протаминовые, обеспечивая минимизацию объема головки сперматозоида и защиту целостности ее генетического материала. При нарушениях компактизации хроматина в ядрах головок сперматозоидов повышается его чувствительность к повреждающим факторам внешней среды (окисление или повышение температуры в женском генитальном тракте), что в свою очередь может приводить к фрагментации ДНК сперматозоида. Данные полученные разными исследовательскими группами противоречивы: одни обнаруживают взаимосвязь между увеличением головки сперматозоида и нарушени-

ем целостности его ДНК [45], другие не подтверждают этого [17].

Уменьшение размеров головки сперматозоида скорее вызвано не нарушением компактизации хроматина, а уменьшением размера акросомы или снижением объема генетического материала. Но прямых доказательств взаимосвязи между уменьшением размеров головки сперматозоида и нуллисомией не обнаружено [41]. Однако такое нарушение морфологии головки сперматозоида, помимо очевидных затруднений акросомной реакции и снижения эффективности оплодотворения в программах ИИ и ЭКО, приводит к снижению эффективности оплодотворения в циклах ИКСИ и нарушению развития эмбрионов [22, 60].

2.2. Изменение формы головки сперматозоида с сохранением симметричности

В одну группу можно отнести изменения формы сперматозоида с сохранением симметричности головки: вытянутая или сигарообразная, грушевидная и круглая.

Наибольшее внимание в этой группе было уделено особенностям, связанным с круглой головкой сперматозоида. Основной характеристикой таких сперматозоидов является отсутствие акросомы, что приводит к невозможности самостоятельного оплодотворения, и поэтому для пациентов с глобозоспермией всегда проводится ИКСИ. Однако и при ИКСИ эффективность оплодотворения снижена, что вызвано снижением способности таких сперматозоидов к активации ооцита [28]. Наши собственные исследования не обнаружили повышения общего уровня численных и структурных хромосомных аномалий в сперматозоидах с круглой головкой [2], что согласуется с мнением других авторов [6, 27]. Но в аналогичных исследованиях зарегистрирован повышенный уровень анеуплоидии [12, 46]. В эякуляте пациентов с глобозоспермией отмечается также увеличение доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК [27, 14]. К генетическим нарушениям свойственным сперматозоидам с круглой головкой также относятся изменение соотношения протаминов P1/P2 и высокий уровень незамещенных гистонов [9]. Такие особенности делают сперматозоид более уязвимым к внешним воздействиям, что объясняет повышенный уровень фрагментации ДНК. Однако следует заметить, что диагноз глобозоспермия ставится при нарушении морфологии в 100% сперматозоидах, а доля сперматозоидов с фрагментацией ДНК оставляет по разным данным от 13 до 80% [27, 14]. Таким образом, нарушение структуры хроматина не является обязательной характеристикой сперматозоида с круглой головкой.

Также следует отметить, что помимо нарушения головки для пациентов с глобозоспермией харак-

терны аномалии шейки сперматозоидов, что также может являться причиной нарушения оплодотворения и дробления из-за дисфункции centrosомы [5].

Грушевидная и удлинённая форма головки являются достаточно распространенными формами аномалии сперматозоидов. При удлинённой головке степень деформации может быть различной: от незначительного изменения соотношения длины и ширины головки до сигарообразной формы. При анализе частоты гетероплоидии в таких сперматозоидах нами не было зарегистрировано повышения доли сперматозоидов с численными и структурными аберрациями, что противоречит некоторым данным литературы [2, 41, 77]. В отношении сперматозоидов с грушевидной головкой таких исследований не проводилось.

2.3. Изменение формы головки сперматозоида с нарушением симметричности

Все изменения регулярной формы строения головки сперматозоида традиционно объединяются в группу аморфных головок. Такие изменения достаточно распространены и, по мнению многих авторов, связаны с наиболее серьезными нарушениями генетического материала сперматозоидов. Так, на увеличение доли гетероплоидии в таких сперматозоидах указывают данные, полученные как с использованием FISH [50], так и результаты кариотипирования индивидуальных сперматозоидов [2]. В этой связи уместно отметить, что хромосомы занимают строго определенное положение в головке сперматозоида [57, 15, 81]. По-видимому, дополнительный генетический материал может нарушать этот порядок и приводить не только к увеличению размера, но и к нарушению пропорций головки сперматозоида.

Существуют данные, что у аморфных сперматозоидов чаще нарушено протаминирование ДНК и плотность упаковки хроматина [11], что вероятнее всего является причиной повышения уровня фрагментации ДНК [67].

Кроме того, для сперматозоидов с аморфной, а также грушевидной и удлинённой головкой также более характерно нарушение подвижности [39], что вероятно вызвано аномалиями шейки и может объяснить снижение эффективности оплодотворения такими сперматозоидами даже в программах ИКСИ [33, 39].

2.4. Наличие вакуоли в головке

Особую группу составляют сперматозоиды с вакуолизированной головкой. Этот тип аномалий часто сопутствует другим морфологическим изменениям головки, но иногда встречается и как изолированная патология. Это единственный тип аномалии, который может быть приобретен сперматозоидом уже после завершения этапа спермиогенеза и формирования головки [36].

Относительно происхождения вакуоли нет единого мнения: одни исследователи говорят о преимущественной акросомной локализации [68], другие об исключительно ядерной локализации [7]. Кроме того, размеры вакуолей широко варьируют: от маленьких, до занимающих большую часть головки. В последнем издании ВОЗ наличие 1 мелкой вакуоли не считается патологией. Наоборот, крупные вакуоли (занимающие более 13% площади головки) по мнению многих исследователей, связаны с фрагментацией ДНК [63, 65, 7], нарушением конденсации хроматина, а также с повышением доли гетероплоидии [7].

2.5. Аномалии шейки сперматозоида

Очевидно, что значительные изменения в шейке сперматозоида, вызванные аномалиями локомоторного аппарата и отражающимися на ее морфологических особенностях, сказываются на подвижности сперматозоида и могут приводить к нарушениям оплодотворения и развития эмбриона (см. выше). Но оценивать морфологические особенности шейки сперматозоида даже при нормальной подвижности не менее важно. Так изменение только формы шейки сперматозоида значительно снижает эффективность оплодотворения и нарушает дальнейшее развитие эмбриона [76]. С другой стороны атипичное строение жгутика сперматозоида, оказывая влияние на подвижность сперматозоида, не влияет на эффективность оплодотворения в программах ИКСИ [33].

Таким образом, можно сделать заключение, что аномалии строения сперматозоида связаны с нарушением в строении и функционировании его генома и отражаются на развитии эмбриона. Однако и массовый и индивидуальный анализ позволяет говорить лишь о различной степени сопряженности этих характеристик.

Данные о взаимосвязи между параметрами спермограммы, морфологическими особенностями сперматозоидов, частотой хромосомных aberrаций и целостностью ДНК, указывают на вероятность того, что гены, участвующие в мейотическом делении, способные влиять на расхождение хромосом, по-видимому, могут обладать некоторым плейотропным действием и нарушать процесс спермиогенеза, а именно, характер упаковки хроматина и формирование головки сперматозоида. Принимая во внимание сохранение прямых цитоплазматических контактов между сперматидами одной генерации [23, 54], можно предполагать, что геномные и хромосомные мутации, возникающие на предшествующих стадиях сперматогенеза, могут оказывать прямой повреждающий эффект при упаковке ДНК и формировании головки спермия. При этом последний может проявляться не в единичных, а сразу во многих спермиях всей генера-

ции, относящихся к одной волне сперматогенеза. Результаты анализа эякулята пациентов со сходными аномалиями головки сперматозоидов (аплазия акросомы) также указывают на существование наследственной компоненты [26]. Увеличение доли сперматозоидов с тяжелыми морфологическими аномалиями часто сопровождается и снижением концентрации спермиев, что вызвано не снижением спермопродукции, а блокированием сперматогенеза, с последующей деградацией сперматогенных клеток [2]. Усиление апоптотических процессов в сперматогенезе изменяет микроокружение нормальных сперматогониев, что может являться причинной мейотических нарушений и образования гетероплоидных сперматозоидов [51]. Возможно, что такая ситуация приводит к аномальной компактизации хроматина, провоцируя образование разрывов в ДНК, и влияет на процесс формирования головки сперматозоида.

Можно утверждать, что нормальная морфология и подвижность сперматозоида не гарантирует отсутствие генетических и цитологических дефектов, и наоборот, при большинстве вариантов морфологических аномалий возможно нормальное оплодотворение и развитие эмбриона (исключение составляют только мегалоцефалические головки сперматозоидов), что дает шанс на рождение здорового ребенка и при очень тяжелых формах астено и тератозооспермии. Тем не менее, в клинической практике предлагаются несколько способов оценки потенциала сперматозоида с целью повышения эффективности процедуры ИКСИ.

Сейчас наиболее распространенным является метод, предложенный доктором Бенжамином Бартов — ИМСИ (IMSI — motile sperm organellar morphology examination), в котором используются строгие критерии, разработанные на основе результатов сканирующей электронной микроскопии: гладкость, симметричность и форма сперматозоида [48, 59, 58]. Оценивается морфологический статус 6 субклеточных органелл: акросома, постакросомальный регион, шейка, митохондрии, хвост и головка. Грубые аномалии строения, такие как аморфная, конусовидная, круглая, точечная или многоядерная головка из отбора исключаются сразу, остальные сперматозоиды делятся на 3 категории качества по наличию вакуолей и овальности строения головки. Авторы сообщают об увеличении эффективности до 66%.

Другая школа основана на балльной оценке головки, имеющих вакуолей и базальной части сперматозоида. Норма — 1 балл, патология — 0 баллов. Окончательная оценка сперматозоида вычисляется по формуле: оценка = (балл головки*2) + (балл вакуолей*3) + (балл базальной части), тогда как акросома, шейка и цитоплазматическая капля

являются второстепенными критериями. Таким образом, оценка сперматозоида составляет от 0 до 6 баллов, с максимальным баллом для морфологически нормального сперматозоида [3].

Согласно результатам последних лет использование ИМСИ оправдано. ИМСИ не увеличивает эффективность оплодотворения, но значительно улучшает имплантацию эмбрионов, вероятность наступления беременности, и снижает риск спонтанного прерывания беременности [34], а также снижает вероятность образования эмбриона с несбалансированным кариотипом [49].

2.6. Отбор сперматозоидов по биохимическим маркерам

Поверхностная мембрана сперматозоидов человека — важная составляющая, определяющая возможность оплодотворения в естественных условиях и в условиях *in vitro*. Будучи гаплоидными клетками, сперматозоиды имеют поверхностные антигены, отличные от остальных соматических диплоидных клеток. Сперматогенный эпителий хорошо защищен от инфекционных и токсических воздействий гематотестикулярным барьером, который нарушается в исключительных случаях. При повреждении проницаемости или структуры этого барьера, образованного собственной оболочкой семенных канальцев и цитоплазмой sustentоцитов, сперматозоиды вызывают синтез антиспермальных антител (IgG и IgA), которые связываясь с поверхностными антигенами сперматозоидов (белками теплового шока HSP), ингибируют нормальную акросомную реакцию и связывание сперматозоида с блестящей оболочкой, препятствуя оплодотворению [52]. Наиболее частыми причинами образования антиспермальных антител являются инфекции, варикоцеле, крипторхизм и аутоиммунные заболевания. По результатам ИКСИ с использованием таких сперматозоидов эффективность оплодотворения, развитие эмбрионов и частота наступления беременности не снижена [61].

В качестве антигенов для иммуноглобулинов чаще всего выступают белки теплового шока [37]. Наибольшее внимание уделяют тестис-специфичному белку HSPA2, относящемуся к группе шаперонов HSP70. Синтез этого белка начинается в профазе мейоза (лепотена-зиготена), он участвует в формировании синаптонемного комплекса, связываясь с латеральным элементом, принимает участие в регуляции клеточного цикла и апоптотических процессов [18]. Мутации, связанные с нарушением работы этого белка приводят к аномалиям мейоза, что является причиной блокирования сперматогенеза, снижения концентрации сперматозоидов и повышения частоты гетеропloidии в зрелых сперматозоидах. Вторая волна экспрессии гена HSPA2 происходит во время со-

зревания сперматид, белок принимает участие в качестве шаперона в компактизации хроматина сперматозоида, замене гистонов протаминами в сперматиде [56]. Полагают также, что такие события как экструзия цитоплазмы, ремоделирование плазматической мембраны и формирование рецепторов связывания с блестящей оболочкой и гиалуроновой кислотой также протекают с участием этого белка [32].

Сейчас в лабораторную практику вводят отбор сперматозоидов по способности связываться с гиалуроновой кислотой. Гиалуроновая кислота является основным компонентом внеклеточного матрикса кумулюсных клеток и играет решающую роль в отборе сперматозоидов способных к оплодотворению. Только зрелые сперматозоиды способны связаться с яйцеклеткой. Фактически, гиалуроновая кислота играет роль фактора для «физиологического отбора» и ИКСИ с использованием гиалуроновой кислоты имеет собственное название ПИКСИ (Physiologic ICSI). Многочисленные исследования показали, что сперматозоиды связывающиеся с гиалуроновой кислотой, обладают целостной ДНК [69], низким уровнем остаточных гистонов [21] и сниженным уровнем анеупloidии [35], что положительно сказывается на качестве полученных эмбрионов и частоте наступления беременности [55, 20].

Возможно именно этот механизм, опосредованный через экспрессию HspA2, обеспечивает естественный отбор яйцеклеткой генетически сбалансированных сперматозоидов. По данным некоторых исследователей отбор сперматозоидов одновременно по методике ПИКСИ (способность связываться с гиалуроновой кислотой) и ИМСИ (отбор по морфологии) повышает эффективность оплодотворения, скорость дробления эмбрионов и частоту наступления беременности [62]. Однако специальные исследования, направленные на выявление взаимосвязи между морфологическими особенностями сперматозоидов и степенью их готовности к оплодотворению, не находят корреляции между этими двумя параметрами [19]. На настоящем этапе развития ВРТ подобные исследования имеют важное значение для оценки потенциала оплодотворения сперматозоида и их влияния на развитие эмбриона. Кроме того, это позволит оценить возможный генетический риск передачи потомству наследственной патологии и найти подходы к контролю за увеличением генетического груза популяции, связанного с применением ВРТ.

Литература

1. Кулаков В.И., Леонова Б.В., Кузьмичева Л.Н. Лечение мужского и женского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии. — М.: МИА, 2005. — 589 с.

2. Цитогенетический анализ сперматозоидов человека с использованием внутрицитоплазматической инъекции в ооциты мыши / Федорова И.Д. [и др.] // Генетика. — 2005. — Т. 41, № 3. — С. 396–404.
3. A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality / Casuso N.G. [et al.] // Fertil. Steril. — 2009. — Vol. 92, N 5. — P.1616–1625.
4. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia / Pelliccione F. [et al.] // Fertil. Steril. — 2011. — Vol. 95, N 2. — P.641–646.
5. Analysis of the human sperm centrosomal function and the oocyte activation ability in a case of globozoospermia, by ICSI into bovine oocytes / Nakamura S. [et al.] // Hum. Reprod. — 2002. — Vol. 17, N 11. — P. 2930–2934.
6. Analysis of the oocyte activating capacity and chromosomal complement of round-headed human spermatozoa by their injection into mouse oocytes / Rybouchkin A. [et al.] // Hum. Reprod. — 1996. — Vol.11, N 10. — P.2170–2175.
7. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles / Perdrix A. [et al.] // Hum. Reprod. — 2011. — Vol.26, N 1. — P. 47–58.
8. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects — a systematic review / Hansen M. [et al.] // Hum. Reprod. — 2005. — Vol. 20, N 2. — P. 328–38.
9. Blanchard Y., Lescoat D., Le Lannou D. Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa // Andrologia. — 1990. — Vol.22, N 6. — P.549–555.
10. Children born after intracytoplasmic sperm injection: population control study / Sutcliffe A.G. [et al.] // BMJ. — 1999. — Vol. 318, N 7185. — P.704–705.
11. Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility / Iranpour F.G. [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. — 2000. — Vol.17, N 1. — P. 60–66.
12. Chromosome 15 aneuploidy in the sperm and conceptus of a sibling with variable familial expression of round-headed sperm syndrome / Carrell D.T. [et al.] // Fertil. Steril. — 2001. — Vol. 76. — P.1258–1260.
13. Clinical significance of sperm DNA damage threshold value in the assessment of male infertility / Venkatesh S. [et al.] // Reprod. Sci. — 2011. — Vol. 18, N 10. — P. 1005–1013.
14. Complete globozoospermia associated with PLCzeta deficiency treated with calcium ionophore and ICSI results in pregnancy / Taylor S.L. [et al.] // Reprod. Biomed. Online. — 2010. — Vol.20. — P.559–564.
15. Conservation of chromosome arrangement and position of the X in mammalian sperm suggests functional significance / Greaves I.K. [et al.] // Chromosome Res. — 2003. — Vol. 11. — P. 503–512.
16. Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters / Mehdi M. [et al.] // Andrologia. — 2009. — Vol.41, N 6. — P. 383–386.
17. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity / Saravia F. [et al.] // Theriogenology. — 2007. — Vol. 68, N 2. — P.196–203.
18. Eddy E.M. Role of heat shock protein HSP70–2 in spermatogenesis // Rev. Reprod. — 1999. — Vol. 4, N 1. — P. 23–30.
19. Efficacy of hyaluronic acid binding assay in selecting motile spermatozoa with normal morphology at high magnification / Petersen C.G. [et al.] // Reprod. Biol. Endocrinol. — 2010. Vol.8. — P. 149.
20. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection / Parmegiani L. [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. — 2010. — Vol. 27, N 1. — P. 13–16.
21. Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity / Razavi S.H. [et al.] // Andrologia. — 2010. — Vol. 42, N 1. — P. 13–19.
22. Fertilization rates of small-head sperm in conventional IVF and ICSI / Kihale P. [et al.] // Arch. Androl. — 2003. — Vol. 49, N 5. — P. 327–329.
23. FISH assessment of aneuploidy frequencies in immature human spermatozoa classified by the absence or presence of the cytoplasmic retention / Kovanci E. [et al.] // Hum. Reprod. — 2001. — Vol.16. — P.1209–1217.
24. From ultrastructural flagellar sperm defects to the health of babies conceived by ICSI / Fauque P. [et al.] // Reprod. Biomed. Online. — 2009. — Vol.19, N 3. — P. 326–336.
25. Genes and male infertility: what can go wrong? / Maduro M.R. [et al.] // J. Androl. — 2003. — Vol.24, N 4. — P. 485–493.
26. Genetic sperm defects and consanguinity / Baccetti B. [et al.] // Hum. Reprod. — 2001. — Vol.16, N 7. — P.1365–1371.
27. Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report / Vicari E. [et al.] // Hum. Reprod. — 2002. — Vol.17, N 8. — P. 2128–33.
28. Globozoospermia revisited / Dam A.H. [et al.] // Hum. Reprod. Update. — 2007. — Vol.13, N 1. — P. 63–75.
29. *Goddijn M., Leschot N.J.* Genetic aspects of miscarriage // *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* — 2000. — Vol.14, N 5. — P. 855–865.
30. *Hassold T., Hall H., Hunt P.* The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going // *Hum. Mol. Genet.* — 2007. — Vol.16. — P. 203–208.
31. *Hassold T.J.* A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions // *Am. J. Hum. Genet.* — 1980. — Vol. 32, N 5. — P. 723–730.
32. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection / Huszar G. [et al.] // *Curr Opin Obstet. Gynecol.* — 2006. — Vol.18, N 3. — P. 260–267.
33. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection / De Vos A. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2003. — Vol.79, N 1. — P. 42–48.
34. Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis / Souza Setti A. [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* — 2010. — Vol. 21, N 4. — P. 450–455.
35. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies / Jakob A. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2005. — Vol. 84, N 6. — P. 1665–1673.

36. Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37 degrees C? / Peer S. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2007. — Vol. 88, N 6. — P. 1589–1594.
37. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease / Bohring C. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* — 2001. — Vol. 7, N 2. — P. 113–118.
38. Kartagener's Syndrome / Dhar D.K. [et al.] // *Mymensingh Med. J.* — 2009. — Vol. 18, N 1. — P. 75–79.
39. *Katz D.F., Diel L., Overstreet J.W.* Differences in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa // *Biol. Reprod.* — 1982. — Vol. 26, N 4. — P. 566–570.
40. *Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S.* Sperm morphology features as a prognostic factor in vitro fertilization // *Fertil. Steril.* — 1986. — Vol. 46. — P. 1118–1123.
41. *Lee J.D., Kamiguchi Y., Yanagimachi R.* Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes // *Hum. Reprod.* — 1996. — Vol. 11, N 9. — P. 1942–1946.
42. *Lewis S.E., Agbaje I., Alvarez J.* Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis // *Syst. Biol. Reprod. Med.* — 2008. — Vol. 54, N 3. — P. 111–125.
43. *Lewis S.E., Simon L.* Clinical implications of sperm DNA damage // *Hum. Fertil.* — 2010. — Vol. 13, N 4. — P. 201–207.
44. *Ludwig M., Katalinic A.* Malformation rate in fetuses and children conceived after ICSI: results of a prospective cohort study // *Reprod. Biomed. Online.* — 2002. — Vol. 5, N 2. — P. 171–178.
45. Macrocephaly in bull spermatozoa is associated with nuclear vacuoles, diploidy and alteration of chromatin condensation / Revay T. [et al.] // *Cytogenet. Genome Res.* — 2009. — Vol. 126, N 1–2. — P. 202–209.
46. *Martin R.H., Greene C., Rademaker A.W.* Sperm chromosome aneuploidy analysis in a man with globozoospermia // *Fertil. Steril.* — 2003. — Vol. 79, suppl. 3. — P. 1662–1664.
47. Morphological abnormalities in spermatozoa from man and great apes / Seuaner H.N. [et al.] // *Nature.* — 1977. — Vol. 270. — P. 345–347.
48. Morphological characterization of abnormal human spermatozoa using transmission electron microscopy / Bartoov B. [et al.] // *Arch. Androl.* — 1980. — Vol. 5, N 4. — P. 305–322.
49. Morphological nuclear integrity of sperm cells is associated with preimplantation genetic aneuploidy screening cycle outcomes / Figueira R.D. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2011. — Vol. 93, N 3. — P. 990–993.
50. Morphology assessment and fluorescence in situ hybridization of the same spermatozoon using a computerized cell-scanning system / Strassburger D. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2007. — Vol. 22, N 1. — P. 201–209.
51. *Mroz K., Hassold T.J., Hunt P.A.* Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors // *Hum. Reprod.* — 1998. — Vol. 14. — P. 1151–1156.
52. *Naaby-Hansen S., Herr J.C.* Heat shock proteins on the human sperm surface // *J. Reprod. Immunol.* — 2010. — Vol. 84, N 1. — P. 32–40.
53. Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa / Muratori M. [et al.] // *Front. In Bioscience.* — 2006. — Vol. 11. — P. 1491–1499.
54. *Pepling M.E., de Cuevas M., Spradling A.C.* Germline cysts: a conserved phase of germ cell development? // *Trends Cell Biol.* — 1999. — Vol. 9, N 7. — P. 257–262.
55. Physiologic ICSI: hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality / Parmegiani L. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2010. — Vol. 93, N 2. — P. 598–604.
56. Post-meiotic shifts in HSPA2 / HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis / Govin J. [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2006. — Vol. 281, N 49. — P. 37888–37892.
57. Preferential location of sex chromosomes, their aneuploidy in human sperm, and their role in determining sex chromosome aneuploidy in embryos after ICSI / Sbracia M. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2002. — Vol. 17. — P. 320–324.
58. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection / Bartoov B. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2003. — Vol. 80, N 6. — P. 1413–1419.
59. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome / Bartoov B. [et al.] // *J. Androl.* — 2002. — Vol. 23, N 1. — P. 1–8.
60. Relationship between human sperm morphology and acrosomal function / Menkveld R. [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 2003. — Vol. 20, N 10. — P. 432–438.
61. Results of 55 intracytoplasmic sperm injection cycles in the treatment of male-immunological infertility / Nagy Z.P. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1995. — Vol. 10, N 7. — P. 1775–1780.
62. *Rienzi L.* IMSI and PCSI: do they maximize your ICSI? // *ESHRE campus — Reproductive Andrology.* — Bruxelles, 2007.
63. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI / Franco J.G. Jr. [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* — 2008. — Vol. 17, N 1. — P. 42–45.
64. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis / Zini A. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2008. — Vol. 23, N 12. — P. 2663–2668.
65. Sperm DNA fragmentation as a possible test for evaluation male fertility status / Shilnikova E.M. [et al.] // *Reproductive BioMedicine.* — 2010. — Vol. 20, N 3. — P. 32–33.
66. Sperm mitochondrial mutations as a cause of low sperm motility / Thangaraj K. [et al.] // *J. Androl.* — 2003. — Vol. 24, N 3. — P. 388–392.
67. Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI / Daris B. [et al.] // *Arch. Gynecol. Obstet.* — 2010. — Vol. 281, N 2. — P. 363–367.
68. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin / Kacem O. [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* — 2010. — Vol. 20, N 1. — P. 132–137.
69. Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study / Yagci A. [et al.] // *J. Androl.* — 2010. — Vol. 31, N 6. — P. 566–572.

70. *Spiropoulos J., Turnbull D.M., Chinnery P.F.* Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? // *Mol. Hum. Reprod.* — 2002. — Vol. 8, N8. — P. 719–721.
71. Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia / Perrin A. [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* — 2011. — Vol. 22, N 2. — P. 148–54.
72. Study of aneuploidy in large-headed, multiple-tailed spermatozoa: case report and review of the literature / Perrin A. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2008. — Vol.90, N 4. — P. 1201.
73. Surfing the wave, cycle, life history, and genes / proteins expressed by testicular germ cells. Pt. 1: Background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes / Hermo L. [et al.] // *Microscopy Research and Technique.* — 2010. — Vol.73. — P. 243–278.
74. *Tesarik J., Greco E., Mendoza C.* Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation // *Hum. Reprod.* — 2004. — Vol.19, N 3. — P. 611–615.
75. The genetic basis of infertility / Shah K. [et al.] // *Reproduction.* — 2003. — Vol. 126, N 1. — P.13–25.
76. The shape of the sperm midpiece in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection relates sperm centrosomal function / Ugajin T. [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 2010. — Vol. 27, N 2–3. — P. 75–81.
77. Ultrastructural nuclear defects and increased chromosome aneuploidies in spermatozoa with elongated heads / Prisant N. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2007. — Vol. 22, N 4. — P. 1052–1059.
78. *Van Steirteghem A., Bonduelle M., Liebaers I., Devroey P.* Children born after assisted reproductive technology // *Am. J. Perinatol.* — 2002. — Vol.19, N 2. — P. 59–65.
79. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. — 5-th edn. — Geneva: WHO press, 2010. — 271 p.
80. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. — Cambridge: University press, 1999. — 125 p.
81. *Zalenskaya I.A., Zalensky A.O.* Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei // *Chromosome Res.* — 2004. — Vol. 12. — P. 163–173.

Статья представлена В.С. Барановым,
ФГБУ «НИИАГ им. Д.О. Отта» СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

MORPHOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL SELECTION OF SPERMATOZOA FOR ICSI

Fedorova I. D., Shilnikova E. M., Gzgzyan A. M.

■ **Summary:** Principles of individual sperm selection for fertilization were described, literary dates of correlation between morphological, functional and biochemical parameters of human spermatozoa and structural and functional peculiarities of its genome organization were presented.

■ **Key words:** assistance reproductive technology; ICSI; sperm morphology; chromosome complement of spermatozoa; human spermatozoa; sperm DNA fragmentation; semen parameters; sperm heads.

■ Адреса авторов для переписки

Федорова Ирина Дмитриевна — к. б. н., с. н. с., старший эмбриолог, отделение вспомогательных репродуктивных технологий. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** irendf@mail.ru.

Шилникова Евгения Михайловна — аспирант, кафедра генетики и селекции, Санкт-Петербургский Государственный Университет, Менделеевская линия д. 7/9, лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний человека, отделение вспомогательных репродуктивных технологий. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** iagmail@ott.ru.

Гзгзян Александр Мкртичевич — доктор наук, руководитель отделения вспомогательных репродуктивных технологий. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** iagmail@ott.ru.

Fedorova Irina Dmitrievna — PhD, senior Researcher, embryologist, department of artificial redproductive technologies. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology NWD RAMS. 199034 Russia, St.-Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3. **E-mail:** irendf@mail.ru.

Shilnikova Evgeniya Michailovna — PhD student, department of genetics and breeding, Saint-Petersburg State University, Mendeleevskaya line 7/9, laboratory of prenatal diagnostics of inherited and congenital human diseases, department of artificial redproductive technologies. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology NWD RAMS. 199034 Russia, St.-Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3. **E-mail:** iagmail@ott.ru.

Gzgzyan Alexander Mkrlichevich — Full Doctor, the head of the department of of artificial redproductive technologies. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology NWD RAMS. 199034 Russia, St.-Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3. **E-mail:** iagmail@ott.ru.