

Выявление нарушений мейоза и сперматогенеза методами световой, электронной и флуоресцентной микроскопии

О.Л. Коломиец¹, М.А. Лелекова¹, А.А. Кашинцова¹, Л.Ф. Курило², Е.Е. Брагина², В.Б. Черных²,
М.Ю. Габлия³, И.В. Виноградов³, И.И. Витязева⁴, С.В. Боголюбов⁴, В.Е. Спангенберг¹

¹ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; Россия, 119991 Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

³кафедра клинической андрологии факультета повышения квалификации медицинских работников ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 21, к. 3;

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России;
Россия, 117036 Москва, ул. Дмитрия Ульянова, 11

Контакты: Оксана Леонидовна Коломиец olkolomiets@mail.ru

Введение. Бесплодие диагностируется у 10–15 % пар, желающих иметь детей. Приблизительно в половине случаев это обусловлено снижением фертильности мужчин. Нарушение сперматогенеза нередко вызвано сбоями в течении ключевых событий профазы I мейоза — синапсиса, репарации, рекомбинации и десинапсиса гомологичных хромосом. Все эти события связаны с уникальной структурой мейотического ядра — синаптонемным комплексом. Поведение латеральных элементов синаптонемного комплекса служат парадигмой поведения хромосом в профазе мейоза и индикатором нарушений синапсиса хромосом.

Цель исследования — оценка возможностей использования методов анализа распластанных ядер сперматоцитов для установления причин нарушения сперматогенеза и для оценки генетических и репродуктивных рисков использования тестикулярных сперматозоидов в программах экстракорпорального оплодотворения, использующих технологию интрацитоплазматической инъекции сперматозоида.

Материалы и методы. Исследование выполнено на биоптатах яичек, полученных от инфертильных пациентов методом открытой мультифокальной тестикулярной биопсии. Суспензии клеток микробиоптатов яичек исследовали под световым микроскопом. Структуру синаптонемного комплекса в распластанных ядрах сперматоцитов изучали методом электронной микроскопии. Целевые мейотические белки (SCP3, RAD51, MLH1, γH2AX) в таких ядрах локализовали методом флуоресцентной микроскопии.

Результаты. Описаны возможности светомикроскопического анализа суспензий тестикулярных клеток для оценки состояния сперматогенеза. Детально представлены особенности структурной организации полового (XY) бивалента, лежащие в основе определения стадий профазы I мейоза в сперматоцитах человека. Описаны признаки «ареста» мейоза, нарушения архитектуры мейотических ядер, синапсиса и рекомбинации хромосом, процессов хиазмобразования и транскрипционной инактивации хроматина в сперматоцитах человека в профазе I мейоза.

Заключение. Представленные результаты демонстрируют целесообразность использования методов электронно-микроскопического и иммуноцитохимического анализа распластанных ядер сперматоцитов в практике работы репродуктивных центров. Использование этих методов важно для понимания механизмов формирования бесплодия, выявления генетических и репродуктивных рисков использования тестикулярных сперматозоидов в программах экстракорпорального оплодотворения.

Ключевые слова: сперматогенез, мейоз, сперматоциты, синаптонемный комплекс, «арест» мейоза, бесплодие

Для цитирования: Коломиец О.Л., Лелекова М.А., Кашинцова А.А. и др. Выявление нарушений мейоза и сперматогенеза методами световой, электронной и флуоресцентной микроскопии. Андрология и генитальная хирургия 2018;19(1):22–33.

DOI: 10.17650/2070-9781-2018-19-1-22-33

Detection of human meiotic and spermatogenetic anomalies using light, electron and fluorescence microscopy

O.L. Kolomiets¹, M.A. Lelekova¹, A.A. Kashintsova¹, L.F. Kurilo², E.E. Bragina², V.B. Chernykh², M.Yu. Gabliya³,
I.V. Vinogradov³, I.I. Vityazeva⁴, S.V. Bogolyubov⁴, V.E. Spangenberg¹

¹N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences; 3 Gubkina St., GSP-1, Moscow 119991, Russia;

²Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115522, Russia;

³Department of Clinical Andrology, Faculty of Professional Development of Medical Workers of RUDN University;
10 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

⁴National Medical Research Center of Endocrinology, Ministry of Health of Russia; 11 Dmitriya Ul'yanova St., Moscow 117036, Russia

Introduction. Infertility is diagnosed in 10–15 % of couples wishing to have children. In about half cases, the cause is a disorders of male fertility. Defects of spermatogenesis are often caused by the damages of key events of prophase I meiosis — synapsis, repair, recombination



and desynapsis of homologous chromosomes. All these events are connected with the unique structure of the meiotic nucleus — the synaptonemal complex.

Behavior of the lateral elements of the synaptonemal complex serve as a paradigm of chromosome behavior in the meiosis prophase and an indicator of disorders of the chromosome synapsis.

Objective is the evaluation of the possibilities analysis of the spread spermatocyte nuclei for establishing the causes and mechanisms of spermatogenesis disturbance and identification of the genetic and reproductive risks of using testicular spermatozoa for in vitro fertilization programs using intracytoplasmic sperm injection.

Materials and methods. The material of the study were the biopsies of testes obtained from infertile patients by method of open multifocal testicular biopsy.

The suspensions of testicular cells were examined by light microscopy. The structure of the synaptonemal complexes in spread nuclei of primary spermatocytes was studied by electron microscopy. The target meiotic proteins in such nuclei (SCP3, RAD51, MLH1, γ H2AX) were localized by the fluorescence microscopy.

Results. There were described possibilities of light microscopic analysis of the testicular cells suspensions for the evaluation of spermatogenesis. The features of the structural organization of the sex (XY) bivalent were presented which underlie the determination of the stages of meiotic prophase in human spermatocytes. The signs of the meiotic arrest, the disturbance of the architectonics of meiotic nuclei, synapsis, recombination and chromatin silencing in human spermatocytes at the meiotic prophase I are described in details.

Conclusion. The presented results demonstrate the expediency of introducing methods of electron microscopy and immunocytochemical analysis of the spread spermatocytes nuclei in the practice of the reproductive centers. The using of these methods makes it possible for understanding the mechanisms of infertility genesis, revealing genetic and reproductive risks of using testicular spermatozoa in the fertilization program.

Key words: spermatogenesis, meiosis, spermatocytes, synaptonemal complex, meiotic arrest, infertility

For citation: Kolomiets O.L., Lelekova M.A., Kashintsova A.A. et al. Detection of human meiotic and spermatogenetic anomalies using light, electron and fluorescence microscopy. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2018;19(1):22–33.

Введение

Бесплодие диагностируется в среднем у 15 % супружеских пар, и приблизительно в половине случаев оно связано с нарушением фертильности мужчин. Мужское бесплодие — сложное полиэтиологическое заболевание, причину которого не удается установить, по разным данным, в 30–50 % случаев [1–4]. Угнетение сперматогенеза может быть обусловлено генетическими нарушениями (хромосомными и генными мутациями) [3–6], эпигенетическими механизмами [7], патологиями эндокринной, иммунной и нервной систем, инфекциями, анатомическими дефектами яичка и семявыносящих протоков [1, 3, 4], травмами, стрессом, негативным воздействием факторов среды [1].

Известно, что нарушение фертильности нередко вызвано сбоями в течении ключевых событий центрального звена сперматогенеза (профазы I мейоза) — в процессе формирования и репарации запрограммированных разрывов ДНК (double strand breaks, DSBs), синапсиса, мейотической рекомбинации и десинапсиса гомологов. Нормальное развитие перечисленных событий профазы I мейоза в конечном итоге обеспечивает формирование из диплоидных сперматоцитов гаплоидных сперматозоидов [8–13].

Синапсис, кроссинговер и десинапсис гомологичных хромосом протекают с участием уникальной структуры мейотического ядра — синаптонемного комплекса (СК). Он открыт в 1956 г. независимо друг от друга американскими исследователями М. Мозесом [14] и Д. Фоссетом [15] при электронно-микроскопическом

исследовании ультратонких срезов клеток яичек животных и человека. СК представляет собой трехполосную структуру, состоящую из латеральных (боковых) и центрального элементов. Осевые элементы хромосом формируются на стадии лептотены профазы I мейоза. Далее на стадии зиготены происходят конъюгация и синапсис гомологов. Осевые элементы становятся латеральными элементами СК. Синапсис распространяется вдоль всего мейотического бивалента; между латеральными элементами встраивается центральный элемент СК, образованный поперечными фибриллами, которые соединяют латеральные элементы наподобие зубцов застёжки-«молнии» [8, 16].

Как показало время, открытие СК сыграло революционную роль в исследовании мейоза. Особое значение, несомненно, имело широкое внедрение в практику цитогенетических исследований предложенного S. Counce и G. Meyer [17] метода получения и анализа тотальных препаратов распластанных СК или распластанных ядер сперматоцитов I порядка. Сущность этого метода заключается в том, что под действием гипотонического раствора ядра сперматоцитов I порядка разрываються. Петли хроматина растягиваются в стороны от СК и практически не мешают анализу собственно структуры СК. При исследовании под электронным микроскопом таких распластанных ядер (так называемых спредов), контрастированных азотнокислым серебром, хорошо видны латеральные элементы СК, поведение которых является парадигмой поведения каждого гомолога в структуре СК. Поэтому у гетерозигот



по хромосомным aberrациям удается идентифицировать тонкие различия в структуре гомологов. Таким образом, этот метод позволяет выявлять кольцевые хромосомы, петли в структуре СК у гетерозигот по дупликациям и делециям, мультиваленты у гетерозигот по робертсоновским транслокациям, реципрокным и нереципрокным транслокациям [9]. Следует сказать, что мейотические хромосомы в 10 раз длиннее митотических хромосом, вследствие чего при анализе СК можно обнаружить даже микроaberrации, недоступные для выявления в структуре более компактных дифференциально окрашенных митотических хромосом. При этом относительная длина и центромерные индексы мейотических и митотических хромосом совпадают, что позволяет проводить СК-кариотипирование сперматоцитов I порядка. Важно, что анализ СК выявляет aberrации хромосом, которые затрагивают только половые клетки, т. е. те, что сформированы в яичке *de novo*, в том числе под воздействием мутагенных факторов окружающей среды [9, 18, 19].

В последние годы большинство исследований мейоза проводится с применением иммуноморфологического анализа клеток, позволяющего идентифицировать белки в структуре клетки с помощью меченных флуорохромами антител.

Внедрение этого метода исследования значительно расширило представления о роли белков мейоза в обеспечении процессов синапсиса хромосом, о формировании и репарации DSBs, кроссинговере, транскрипции и подавлении транскрипции в мейозе, эпигенетических событиях, роли «контрольно-пропускных пунктов» (checkpoints) мейоза [20, 21].

К настоящему моменту установлено, что репарация запрограммированных DSBs играет ведущую роль в синапсисе гомологов, формировании хиазм, а в дальнейшем и в правильном разделении гомологичных хромосом.

У носителей мутаций, нарушающих репарацию мейотических DSBs, мейоз блокируется на стадии ранней пахитены. Частичное нарушение формирования хиазм может приводить к анеуплоидии гамет, а тотальное нарушение — к «аресту» сперматогенеза [12]. Даже ограниченный локальный асиняпсис аутосом на стадии пахитены вызывает инактивацию транскрипции асиняптированного хроматина, ассоциацию асиняптированных аутосомных СК-бивалентов с половым (XY) бивалентом и прекращение дифференцировки сперматоцитов на стадии средней пахитены — так называемый пахитенный арест [11, 20, 21].

Таким образом, у гетерозигот по хромосомным aberrациям и у носителей мутаций генов, нарушающих процесс синапсиса хромосом и сопряженной с ним репарации DSBs, «арест» мейоза в профазе I в конечном итоге влечет за собой нарушение фертильности [11, 20, 21].

Было установлено, что на стадии диплотены, когда структура СК постепенно разрушается, элементы СК сохраняются в зоне хиазм вплоть до анафазы I мейоза. Так была выяснена важнейшая механическая роль СК в стабилизации хиазм, удерживающих гомологи в паре вплоть до их расхождения на стадии анафазы I мейоза, и, соответственно, в правильном распределении генетического материала между половыми клетками [9–11].

События профазы I мейоза проходят «контрольно-пропускные пункты» [20, 21]. Известно, что «арест» мейоза в сперматоцитах может произойти на всех стадиях профазы I — от лептотены до диплотены [11].

Достоинства метода анализа СК очевидны, и он остается мощным инструментом выяснения механизмов нарушения сперматогенеза и оогенеза у человека, животных, растений и грибов [11, 18, 19, 22–25].

Целесообразность выявления механизмов патологии мейоза с помощью электронно-микроскопического и иммуноцитохимического анализа тотальных препаратов распластанных СК доказана в многочисленных исследованиях на экспериментальных моделях, в первую очередь на нуль-мутантах по генам мейоза [4, 26, 27]. Методы анализа СК человека давно внедрены в работу репродуктивных центров многих стран [4, 5, 8, 28–31].

Настоящее сообщение основано на собственном опыте электронно-микроскопического и иммуноморфологического анализа препаратов СК в распластанных ядрах сперматоцитов I порядка человека.

Целью исследования является демонстрация возможностей применения методов анализа СК для установления причин нарушения сперматогенеза и для оценки генетических и репродуктивных рисков использования тестикулярных сперматозоидов в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), использующих технологию интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (intracytoplasmic sperm injection, ICSI).

Материалы и методы

Стандартное спермиологическое исследование в соответствии с рекомендациями ВОЗ [32] и патентом РФ «Способ цитологической диагностики нарушения сперматогенеза» [33], стандартное цитогенетическое исследование (анализ кариотипа на культивированных лимфоцитах периферической крови, GTG-окрашивание) и молекулярно-генетическое исследование на наличие частых генетических факторов мужского бесплодия (микроделетий Y-хромосомы в локусе AZF и мутаций гена *CFTR*) проведены в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр».

Биоптаты яичек от мужчин с бесплодием получали методом экстракции сперматозоидов из яичка с использованием микрохирургической техники (microsurgical testicular sperm extraction, micro-TESE) на клинических



базах ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России. Для исследования СК представлен материал, оставшийся после извлечения из канальцев тестикулярных сперматозоидов для дальнейшего использования их в процедурах ЭКО/ICSI. Все пациенты дали добровольное информированное согласие на проведение цитогенетического исследования клеток яичка.

Иммуноцитохимический и электронно-микроскопический анализ распластанных ядер сперматоцитов выполнен в лаборатории цитогенетики ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (ИОГен РАН).

Исследование одобрено этическим комитетом ИОГен РАН.

Приготовление и светомикроскопический анализ суспензии клеток тестикулярной ткани. Фрагменты ткани яичка измельчали в среде Игла, суспензию клеток гомогенизировали с помощью автоматической пипетки. Далее под световым микроскопом оценивали степень гомогенизации клеток и наличие в суспензии сперматоцитов I порядка, тестикулярных сперматозоидов, атипичных и дегенерирующих клеток.

Приготовление препаратов распластанных ядер сперматоцитов I порядка. На поверхность тефлоновой пластины наносили капли 0,2 М раствора сахарозы, на них наслаивали по 1 капле суспензию клеток. Через 2 мин, после распластывания ядер, касались поверхности капель стеклом, покрытым поли-L-лизинном (для иммуноцитологического исследования) или пленкой Falcon (для последующего электронно-микроскопического исследования). Далее фиксировали препараты охлажденным раствором 4 % параформальдегида (pH 8,2). Отмывали препараты в 3 сменах 0,4 % раствора Fotoflo (Kodak, США) (pH 8,2), высушивали и хранили при $t - 20^{\circ}\text{C}$.

Электронно-микроскопическое исследование тотальных препаратов распластанных ядер сперматоцитов. Препараты контрастировали 50 % раствором азотнокислого серебра на водяной бане в термостате при $t + 58^{\circ}\text{C}$ в течение 3–4 ч. Под световым микроскопом отбирали хорошо распластанные ядра, вырезали пленку с помощью алмазного метчика (Carl Zeiss, Германия). Вокруг обведенного кружка пластика капали воду. Всплывший кружок пластика с клетками переносили на бленду для электронной микроскопии. Препараты исследовали и фотографировали под электронным микроскопом JEM-100B (Jeol, Япония).

Иммуноокрашивание препаратов. Для уменьшения риска неспецифического связывания антител с клеточными антигенами антитела разводили в буфере DBS (dilution buffer solution), содержащем 3 % бычьего сывороточного альбумина, 0,05 % Triton X-100 и 0,05 % азида натрия [24].

В качестве первичных антител использовали: 1) кроличьи (или мышинные) поликлональные антитела к белку

SCP3 — основному белку СК и осевых элементов мейотических хромосом (Abcam, Великобритания); 2) мышинные моноклональные антитела к фосфорилированному гистону γH2AX , маркирующие участки незавершенной репарации DSBs, в которых транскрипционная активность хроматина подавлена; 3) поликлональные кроличьи антитела к белку RAD51, маркирующие ранние рекомбинационные узелки (Abcam, Великобритания); 4) моноклональные мышинные антитела к белку MLH1, маркирующие поздние рекомбинационные узелки — участки формирования хиазм (Abcam, Великобритания); 5) поликлональные аутоантитела человека к белкам кинетохора (CREST), маркирующие центромерный район хромосом (Invitrogen, США).

В качестве вторичных антител использовали: 1) бычьи антитела к IgG кролика, конъюгированные с FITC (Santa Cruz, США); 2) куриные антитела к IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 594 (Invitrogen, США); 3) лошадиные антитела к IgG мыши, конъюгированные с FITC; 4) бычьи антитела к IgG кролика, конъюгированные с FITC (Jackson, США); 5) козьи антитела к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 546 (Invitrogen, США); 6) козьи антитела к IgG человека, конъюгированные с Alexa Fluor 546 (Invitrogen, США).

Препараты инкубировали с первичными антителами при $t + 4^{\circ}\text{C}$ в течение ночи; промывали в 3 сменах натрий-фосфатного буфера. Далее наносили вторичные антитела и инкубировали препараты в течение 2 ч при $t + 37^{\circ}\text{C}$. Затем промывали в натрий-фосфатном буфере и заключали в среду Vectashield (Vector Laboratories, США), содержащую флуоресцирующий голубой краситель DAPI, избирательно окрашивающий ДНК.

Препараты анализировали с помощью универсального флуоресцентного микроскопа Axio Imager D1 (Carl Zeiss, Германия), соответствующего стандарту IC³S-оптики, оборудованного объективами Plan-Neofluar (при использовании 40× и 100×), ртутной лампой HBO, черно-белой CCD-камерой накопления сигнала AxioCam HRm Rev. 2 (Carl Zeiss, Германия), набором комбинированных фильтров для флуорохромов, имеющего выход на компьютер (Fujitsu-Siemens Technology Solutions, Германия). Документирование фотоизображений выполняли с помощью программы Axiovision rel. 4.6. Изображения обрабатывали в программе Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, США). На иммуноокрашенных препаратах каждую клетку фотографировали, записывали их нониусы. В некоторых случаях проводили 2-й и 3-й раунды иммуноокрашивания, детали многократного иммуноокрашивания описаны нами ранее [23, 25].

Результаты

Светомикроскопическое исследование суспензии тестикулярных клеток, полученных из микробиоптатов яичка пациентов. Исследование суспензий позволяет быстро, за несколько минут, оценить степень нарушения

сперматогенеза, выявить клетки в профазе I мейоза и, следовательно, определить возможность и целесообразность проведения довольно длительных процедур распластывания ядер сперматоцитов I порядка, фиксации и иммуноокрашивания препаратов. При отсутствии сперматоцитов (рис. 1а) изготовить препарат СК и тем более получить из такой «пустой» суспензии тестикулярные сперматоциты не удастся.

На рис. 1б и 1в приведены фотографии суспензий, в которых видны типичные сперматоциты I порядка и единичные тестикулярные сперматозоиды. Таким образом, предварительный анализ позволяет оценить перспективы не только получения тотальных препаратов распластанных СК из клеток биоптата, но и извлечения из таких суспензий тестикулярных сперматозоидов для ICSI.

Электронно-микроскопическое исследование синаптного комплекса. При электронно-микроскопическом исследовании распластанных ядер сперматоцитов, контрастированных азотнокислым серебром, структура СК выявляется четко. У многих пациентов встречаются как атипичные, так и нормальные сперматоциты.

На рис. 2 представлен нормальный сперматоцит I порядка, полученный из микробиоптата пациента с секреторной азооспермией. Сперматоцит на стадии средней пахитены, в нем не выявлено отклонений от нормы. Все аутосомные СК полностью сформированы. Половой (XY) бивалент находится на периферии ядра и формирует типичное для самцов млекопитающих «половое тельце».

Однако у многих инфертильных пациентов нормальные сперматоциты встречаются довольно редко или не встречаются вообще. При анализе полученных результатов в первую очередь необходимо определить,

на какой стадии профазы I мейоза находится каждый сперматоцит. Опорными маркерами стадий профазы I в мужском мейозе служат специфические для каждой из них особенности ультраструктуры осевых элементов полового (XY) бивалента и, конечно, соответствующие каждой стадии особенности структуры осевых элементов и СК аутосом [28].

Идентифицировать половые хромосомы до стадии поздней зиготены довольно трудно. Идентифицировать половой бивалент среди длинных аутосом удается начиная со стадии поздней зиготены, когда аутосомы почти завершают синапсис, а асинэпированными остаются лишь X- и Y-хромосомы (рис. 3а). Далее на стадии ранней пахитены X- и Y-хромосомы сближаются теломерными концами, и между ними формируется короткий участок СК. На протяжении пахитены участок синапсиса между X- и Y-хромосомами увеличивается, осевые элементы приобретают выросты, рядом с асинэпированными участками осевых элементов начинают группироваться глобулы электронно-плотного материала, в осевом элементе X-хромосомы иногда различаются 2 нити (рис. 3б). В конце средней пахитены XY-бивалент формирует «половое тельце»: превращается в клубок тонких нитей и выселяется на периферию ядра (рис. 3в).

Электронно-микроскопическое исследование распластанных ядер сперматоцитов позволяет обнаружить в них различные типы нарушений. У пациентов с нарушением фертильности «арест» сперматогенеза может происходить на стадиях ранней лептотены — диплотены, однако наиболее часто встречаются сперматоциты с признаками «ареста» мейоза на стадии пахитены. Типичным признаком пахитенного ареста является нарушение формирования структуры «полового тельца» —

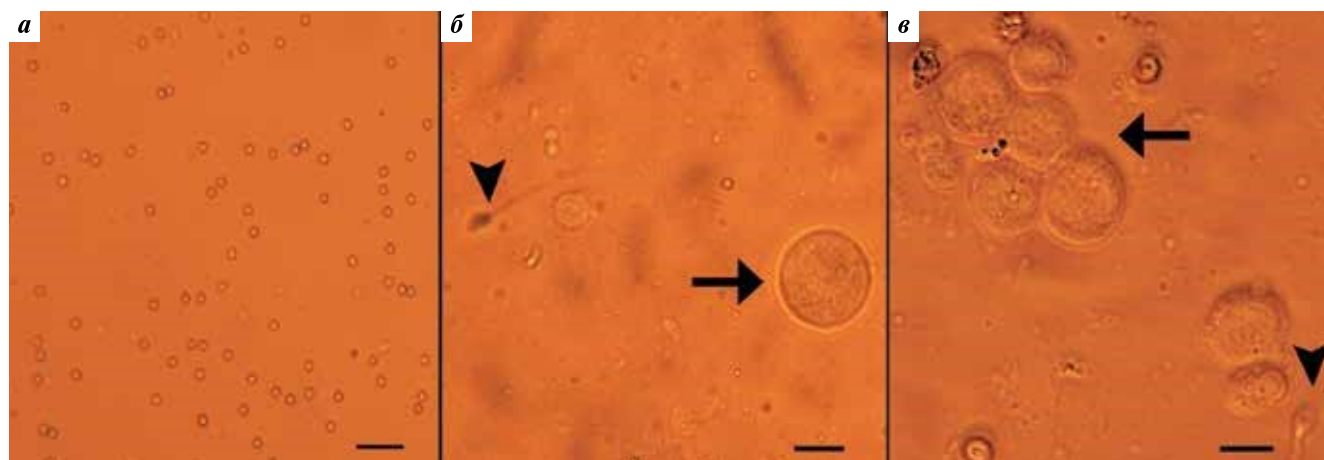


Рис. 1. Суспензии тестикулярных клеток, полученных из микробиоптатов яичка 3 пациентов с азооспермией: а — отсутствие половых клеток; б — единичный сперматоцит I порядка (стрелка) и тестикулярный сперматозоид (головка стрелки); в — большое количество сперматоцитов I порядка (стрелка) и тестикулярный сперматозоид (головка стрелки). Световая микроскопия. Масштабный отрезок 10 мкм

Fig. 1. Suspensions of testicular cells obtained from testis biopstat of 3 patients with azoospermia: а — the lack of germ cells; б — single spermatocyte I (arrow) and testicular sperm (head of arrow); в — the large number of spermatocytes I (arrow) and testicular sperm (head of arrow). Light microscopy. Scale bar 10 μm



Рис. 2. Тотальный препарат распластанных синаптонемных комплексов (СК), полученный из биоптата пациента с секреторной азооспермией. Стадия средней пахитены. Видны 22 аутомомных СК-бивалента и расположенное на периферии ядра «половое тельце», образованное половым (XY) бивалентом. Электронная микроскопия. $\times 5000$

Fig. 2. Total spread synaptonemal complexes (SC), obtained from biopsy of a patient with secretory azoospermia. Middle stage pachytene. Visible 22 autosomal SC bivalent and located on the periphery of the nucleus the sex body formed by the XY bivalent. Electron microscopy. $\times 5000$

ассоциация полового бивалента с аутосомами и «заякоривание» X- и Y-хромосом среди аутомом (рис. 4а). У мужчин как с обструктивным, так и с необструктивным (секреторным) бесплодием признаки пахитенного

«ареста» нередко удается выявить в ядрах сперматоцитов, в которых никаких нарушений синапсиса аутомом не обнаруживается. У пациентов с делециями локуса AZF часто наблюдается фрагментация хромосом.

У пациентов с нарушением фертильности и нормальным кариотипом часто выявляются кольцевые хромосомы (рис. 4б). У пациента с установленной ломкостью хромосомы 22 в 1 ядре встречали по 2 и даже по 3 кольцевых СК-бивалента.

Иммуноцитохимическое исследование распластанных ядер сперматоцитов. Этот метод также позволяет изучить клетки на всех стадиях профазы I мейоза. На стадии лептотены в распластанных ядрах сперматоцитов видны осевые элементы хромосом, которые выявляются с помощью антител к SCP3. Постепенно осевые элементы формируются вдоль каждой хромосомы (рис. 5а). На стадии зиготены начинается синапсис гомологичных хромосом. При иммуноокрашивании антителами к гистону γ H2AX наблюдается широкое распространение этого гистона по участкам асинхронизированного хроматина (рис. 5б), так как в асинхронизированных участках еще не произошла репарация большинства запрограммированных DSBs. Прямым доказательством незавершенности репарации является и множество фокусов белка RAD51, маркирующего ранние рекомбинационные узелки (рис. 5в). На этих стадиях идентифицировать половой (XY) бивалент трудно. Начиная со стадии ранней пахитены в иммуноокрашенных препаратах половой бивалент легко идентифицировать с помощью разных комбинаций антител: к белкам SCP3 и RAD51 (рис. 5г), или к SCP3 и гистону γ H2AX,

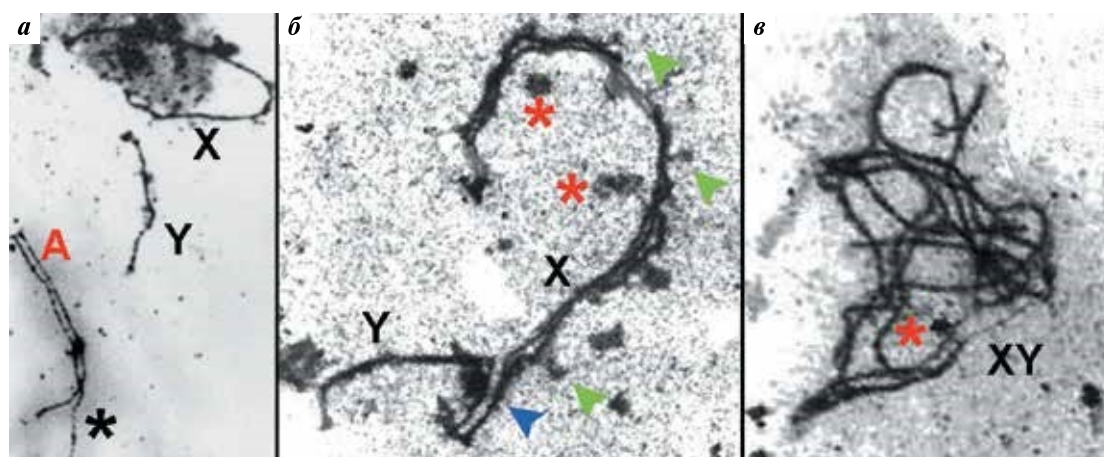


Рис. 3. Структура полового бивалента на 3 стадиях профазы I мейоза. Электронная микроскопия: а — поздняя зиготена: X- и Y-хромосомы сближены; аутосомы частично асинхронизированы (звездочка). $\times 5000$; б — конец ранней пахитены: между X- и Y-хромосомами сформирован короткий фрагмент синаптонемного комплекса (синяя стрелка); асинхронизированный участок осевого элемента утолщен и раздвоен; вблизи XY-бивалента видны скопления электронно-плотного материала (красная звездочка). $\times 9000$; в — конец средней пахитены: «половое тельце» сформировано и располагается на периферии ядра; тонкие осевые элементы X- и Y-хромосом формируют клубок. $\times 11\,000$

Fig. 3. The structure of the sex bivalent at the 3 stages of prophase I of meiosis. Electron microscopy: a — late zygotene: X and Y chromosomes are close; autosomes are partially asynapsed (asterisk). $\times 5000$; b — the end of the early pachytene: between X and Y chromosomes formed a short fragment of a synaptonemal complex (blue arrow); asynapsed parts of the axial element is thickened and bifurcated; near XY bivalent clusters of electron-dense material (red asterisk) are visible. $\times 9000$; v — the end of the middle pachytene: the sex body is formed and is located on the periphery of the nucleus; thin axial elements of the X and Y chromosomes form a ball. $\times 11\,000$

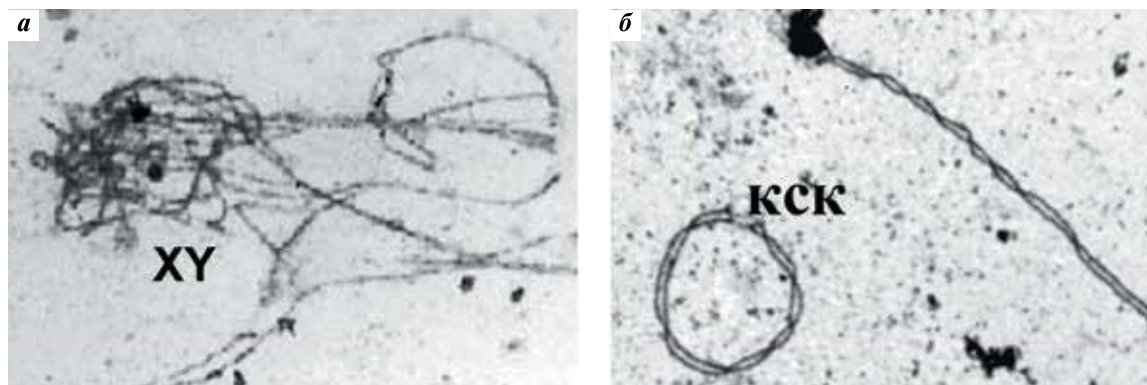


Рис. 4. Нарушения в структуре синаптонемных комплексов (СК) в распластанных ядрах сперматоцитов. Электронная микроскопия: а — типичный признак пахитенного «ареста» — ассоциация полового (XY) бивалента с частично асинептированными аутосомными СК-бивалентами. $\times 7000$; б — кольцевой СК-бивалент (KCK). $\times 6000$

Fig. 4. Disturbance in the structure of the synaptonemal complexes (SC) in spread nuclei of spermatocytes. Electron microscopy: a — a typical symptom of pachytene arrest — the association of the sex body — the XY bivalent with partially asynaphylene autosomal SC bivalente. $\times 7000$; б — the ring of SC bivalent (KCK). $\times 6000$

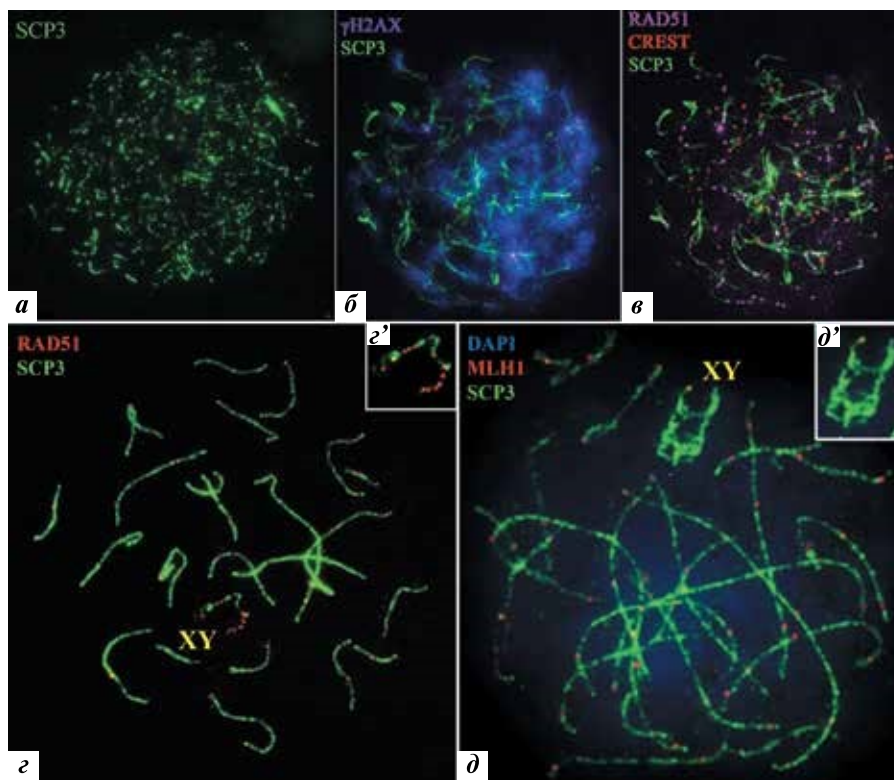


Рис. 5. Распластанные ядра сперматоцитов на стадиях лептотены — поздней пахитены. Иммуноцитохимическое исследование: а — лептотена: видны тонкие формирующиеся осевые элементы хромосом, маркированные антителами к белку SCP3 (зеленый); б — ранняя зиготена: осевые элементы хромосом и формирующиеся участки синаптонемных комплексов (СК) (зеленый); хроматин, связанный с асинептированными осевыми элементами, маркирован антителами к гистону γ H2AX (фиолетовый); в — та же клетка, что и на рис. 5б: множественные фокусы белка RAD51 (розовый), SCP3 (зеленый); центромеры маркированы антителами CREST (красный); з — ранняя пахитена: на аутосомных СК (зеленый) видны единичные сигналы RAD51 (красный); XY-бивалент лежит в центре распластанный ядра сперматоцита, вдоль асинептированных осевых элементов X- и Y-хромосом сохраняется множество фокусов белка RAD51 (з'); д — поздняя пахитена: фокусы белка MLH1 (красный) видны на всех аутосомах и в структуре «полового тельца» (XY) (д'); хроматин окрашен DAPI (синий)

Fig. 5. Spread nuclei of spermatocytes at the leptotene stage — late pachytene. Immunocytochemical study: a — leptotene: thin forming axial elements of chromosomes marked with antibodies to the protein SCP3 (green) are visible; б — early zygotene: axial elements of chromosomes and emerging areas of the synaptonemal complexes (SC) (green); chromatin associated with asynapsed axial elements are labeled with antibodies to histone γ H2AX (purple); в — the same cell as in Fig. 5б: multiple protein foci RAD51 (pink), SCP3 (green); centromeres are marked by antibody CREST (red); з — early pachytene: on autosomal SC (green) are seen isolated RAD51 signals (red); the XY bivalent lies in the center of the spread nuclei of spermatocyte, along the asynapsed axial elements of the X and Y chromosomes there are many foci of RAD51 protein (з'); д — late pachytene: MLH1 protein focuses (red) are visible on all autosomes and in the structure of the sex body (XY body) (д'); chromatin is DAPI colored (blue)

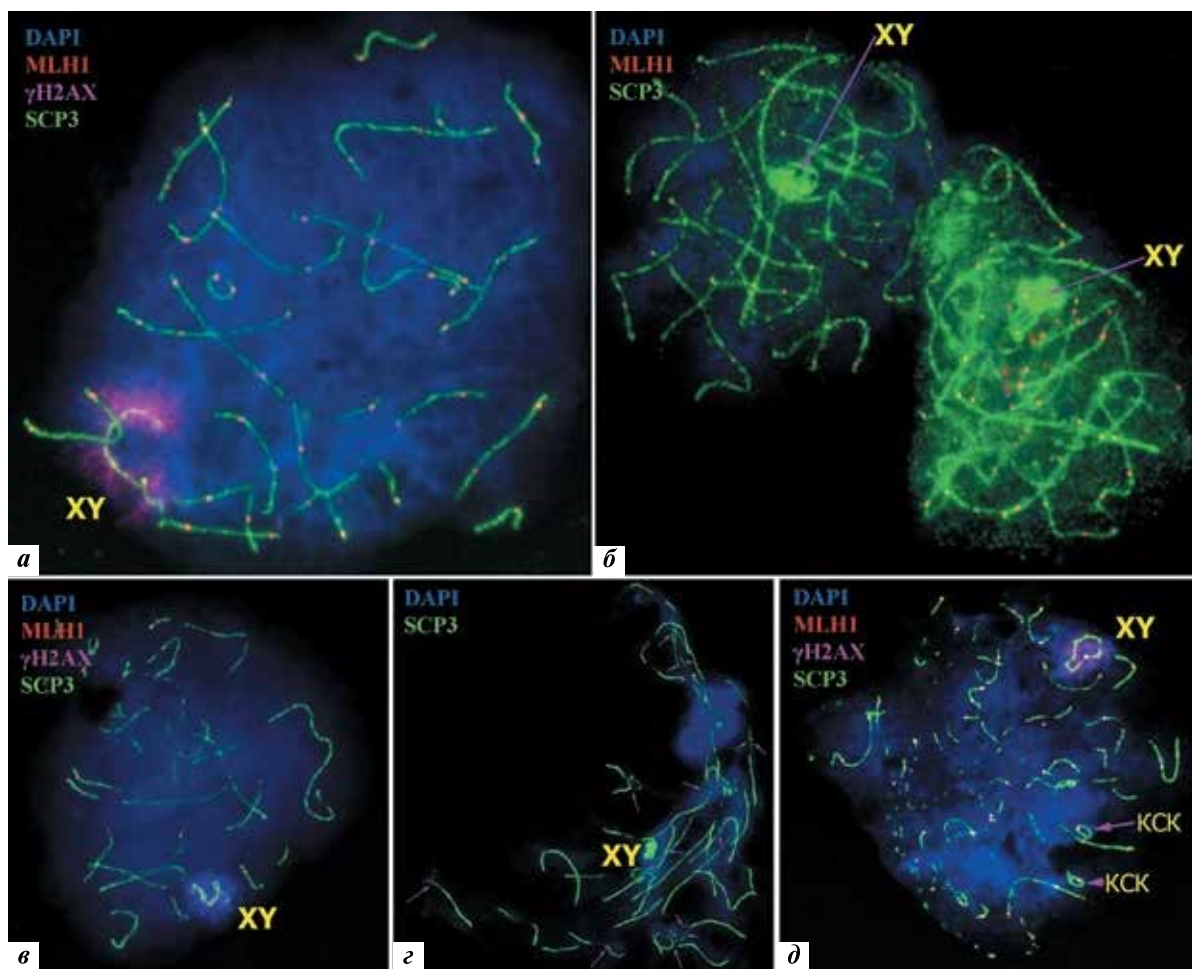


Рис. 6. Типичные нарушения в распластанных ядрах сперматоцитов. Иммуноцитохимическое исследование. Препараты маркированы антителами к белкам: SCP3 (зеленый), MLH1 (красный), гистону γ H2AX (фиолетовый). Хроматин окрашен DAPI (синий): а — ранняя пахитена: ассоциация полового бивалента (XY) с аутосомой; б — средняя пахитена: ассоциация полового бивалента (XY) с аутосомами; отсутствие сигнала MLH1 в структуре полового бивалента (XY); в — единичные фрагменты синаптонемных комплексов; г — нарушение архитектоники ядра; ассоциация полового бивалента (XY) с аутосомами; фрагментация синаптонемных комплексов; д — тотальная фрагментация синаптонемных комплексов, кольцевые синаптонемные комплексы (КСК) в ядре дегенерирующего сперматоцита

Fig. 6. Typical disorders in the spread spermatocytes nuclei. Immunocytochemical study. The preparations are marked with antibodies to proteins: SCP3 (green), MLH1 (red), histone γ H2AX (purple). Chromatin painted with DAPI (blue): а — early pachytene: association of the XY bivalent with autosome; б — average pachytene: association of the XY bivalent with autosomes; absence of MLH1 signal in the structure of the XY bivalent; в — isolated fragments of synaptonemal complexes; г — violation of the architectonics of the nucleus; the association of the XY bivalent with autosomes; the fragmentation of synaptonemal complexes; д — total fragmentation of synaptonemal complexes, ring synaptonemal complexes (KCK) in the nucleus of the spermatocyte degenerating

или к SCP3 и белкам кинетохора. На рис. 5д представлено распластанный ядро сперматоцита I порядка на стадии средней пахитены. На этой стадии половой бивалент легко идентифицируется по конфигурации осевых элементов. Сигналы белка MLH1 выявлены на всех аутосомных СК и половом биваленте.

На рис. 6 представлены наиболее типичные нарушения в структуре распластанных ядер сперматоцитов, которые наблюдаются у пациентов с азооспермией: в ядрах с типичными признаками пахитенного «ареста» (см. рис. 6а, б, г) наблюдается ассоциация X- и Y-хромосом с аутосомами, «половое тельце» не сформировано и не вынесено на периферию ядра. Кроме того, в 1 из 2 ядер на рис. 6б в структуре полового бивалента

отсутствует фокус белка MLH1, что свидетельствует об отсутствии хиазмы между X- и Y-хромосомами.

Характерными нарушениями структуры ядер у пациентов с секреторной азооспермией являются аномалии архитектоники ядер (см. рис. 6г) и фрагментация СК (см. рис. 6в—д). Причем фрагменты СК могут встречаться на стадиях от ранней до поздней пахитены. Иногда наряду с фрагментами в них могут формироваться и кольцевые СК-биваленты (см. рис. 6д).

Обсуждение

Значительный прогресс в расширении представлений о причинах мужского бесплодия в последние десятилетия, несомненно, связан с внедрением в практику



репродуктивных центров процедуры TESE, впервые обеспечившей широкий доступ к исследованию мейоза и сперматогенеза человека [11, 29–31, 34]. Следует подчеркнуть, что предварительный анализ суспензий герминативных клеток, полученных с помощью TESE, весьма информативен. В этом отношении особую значимость имеют данные китайских ученых, выполнивших сравнительное исследование результативности гистологического анализа срезов ткани яичка и анализа суспензий тестикулярных клеток, полученных методом TESE от 1112 пациентов с необструктивной азооспермией. Эти авторы статистически подтвердили целесообразность контроля суспензии клеток тестикулярной ткани, результаты которого по информативности сопоставимы с результатами гистологического анализа. И, что не менее важно, эти авторы показали возможность извлечения из таких суспензий сперматозоидов для использования их в ICSI в тех случаях, когда это не удастся осуществить методом micro-TESE [35].

Анализ суспензий клеток тестикулярной ткани для исследования мейоза человека и животных проводится нами в течение 30 лет, при работе с модельными объектами мы используем суспензии клеток целого яичка. По нашим наблюдениям, этот простой метод дает очень важную, а подчас и совершенно неожиданную информацию о состоянии сперматогенеза. Так, недавно нами обнаружено множество атипичных тестикулярных сперматозоидов в суспензиях клеток семенных канальцев, полученных от триплоидных самцов межвидовых гибридов скальных ящериц *Darevskia*. При анализе СК у этих самцов выявлено тотальное нарушение синапсиса хромосом в профазе I мейоза [23]. Подобные нарушения у самцов млекопитающих неизбежно ведут к «аресту» мейоза на стадии пахитены [23].

Второе значимое событие в исследовании мейоза — открытие СК и совершенствование методов исследования мейоза на основе анализа распластанных ядер сперматоцитов. Выше мы продемонстрировали возможности электронно-микроскопического и иммуноморфологического анализа СК. На основе анализа СК удается определить мельчайшие дефекты синапсиса хромосом, выявить хромосомные перестройки, которые, как известно, могут формироваться в мейозе *de novo* у пациентов с нормальным кариотипом соматических клеток. Хорошо визуализируются нарушения архитектуры ядер, которые, по нашим наблюдениям, всегда связаны с «арестом» мейоза. И наконец, электронно-микроскопический анализ СК дает информацию о стадии, на которой блокируется мейоз, а по нашим данным, у бесплодных пациентов блок мейоза в профазе I может осуществляться на всех стадиях, от прелептотены до диплотены [9].

Иммуноцитохимическое исследование позволяет не только выявить нарушения синапсиса гомологов или признаки «ареста» мейоза, но и установить детали

формирования и репарации DSBs, мейотической рекомбинации, особенности транскрипционной инактивации хроматина, признаки апоптоза сперматоцитов. Эти детали крайне важны для установления механизмов «ареста» мейоза у каждого пациента с тяжелыми формами нарушения сперматогенеза, патозооспермии и мужского бесплодия, для оценки риска формирования анеуплоидных сперматозоидов [29–31, 34, 36].

Необходимость выявления рисков формирования анеуплоидных сперматозоидов подтверждают и данные литературы о том, что частота мейотических ошибок в формирующихся половых клетках человека по крайней мере на порядок выше, чем у животных. Хромосомные аномалии выявляются у 0,5–0,7 % новорожденных, 5–6 % мертворожденных детей и 50–60 % спонтанных абортусов. У мужчин повышенное количество сперматозоидов с анеуплоидией половых хромосом встречается довольно часто [29]. Это увеличивает риск появления потомства с синдромами Клайнфельтера, Шерешевского—Тернера, дисомией по Y-хромосоме и полиплоидией по гоносомам [4]. Известно, что большинство эмбрионов с хромосомными аномалиями погибают на ранних стадиях эмбрионального развития. Однако трисомии по хромосомам 13, 18 и 21 жизнеспособны, как и носители некоторых хромосомных транслокаций, в том числе множественных. Носители таких хромосомных аномалий могут иметь умственные, психические, физические отклонения, нарушения полового развития и репродукции [3, 4, 29]. Оценить уровень анеуплоидии в мужских гаметах по различным хромосомам возможно с помощью иммунофлуоресцентной гибридизации сперматозоидов *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization). Особую актуальность данное исследование представляет для мужчин с аномалиями кариотипа, повторными случаями анеуплоидии у потомства или плода, неудачами ЭКО/ICSI. Основным подходом к выявлению рисков формирования анеуплоидных сперматозоидов является анализ распределения фокусов белка MLH1 в структуре пахитенных СК. К настоящему времени установлена клиническая значимость данных, полученных при исследовании СК у инфертильных пациентов, именно в отношении риска формирования анеуплоидных сперматозоидов [2, 4, 29, 31, 34, 36]. В совокупности эти данные подтверждают целесообразность исследования СК у инфертильных пациентов, а в случае выявления риска формирования анеуплоидных сперматозоидов — необходимость преимплантационной генетической диагностики у эмбрионов.

Естественно, особый интерес представляют данные о мужском мейотическом бесплодии, обусловленном мутациями генов, которые ответственны за прогрессию мейоза и сперматогенеза в целом. К настоящему времени получены убедительные данные о роли в формировании мужского бесплодия делеций



18. Коломиец О.Л., Абудуев Н.К., Мазурова Т.Ф. и др. Повреждающее действие антибиотиков на структуру синаптонемных комплексов мейотических хромосом мыши. *Генетика* 2001;37(2):197–206. [Kolomiets O.L., Abuduev N.K., Mazurova T.F. et al. Damaging effect of antibiotics on the structure of synaptonemal complexes of meiotic chromosome of mice. *Genetika = Genetics* 2001;37(2):197–206. (In Russ.)]. PMID: 11253426.
19. Коломиец О.Л., Ацаева М.М., Дадашев С.Я. и др. Нарушения структуры синаптонемных комплексов и селекции сперматоцитов I порядка мыши в ответ на введение лекарственных препаратов. *Генетика* 2013;49(11):1261–9. [Kolomiets O.L., Atsaeva M.M., Dadashev S.Ya. et al. Damage to synaptonemal complex structure and peculiarities of selection of mouse spermatocytes I at response to drug administration. *Genetika = Genetics* 2013;49(11):1261–9. (In Russ.)]. PMID: 25470926.
20. Turner J., Mahadevaiah S., Fernandez-Capetillo O. et al. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Genetics* 2005;37(1):41–7. DOI: 10.1038/ng1484. PMID: 15580272.
21. Homolka D., Jansa P., Forejt J. Genetically enhanced asynapsis of autosomal chromatin promotes transcriptional dysregulation and meiotic failure. *Chromosoma* 2012;121(1):91–104. DOI: 10.1007/s00412-011-0346-5. PMID: 22002499.
22. Коломиец О.Л., Мазурова Т.Ф., Богданов Ю.Ф. и др. Анализ структуры и поведения синаптонемных комплексов самцов мыши после длительного введения неоквасепта. *Генетика* 1993;29(12):1982–91. [Kolomiets O.L., Mazurova T.F., Bogdanov Yu.F. et al. Synaptonemal complexes of chromosomes of male mice after prolonged administration of neoaquasept. *Genetika = Genetics* 1993;29(12):1982–91. (In Russ.)]. PMID: 8119577.
23. Spangenberg V., Arakelyan M., Galoyan E. et al. Reticulate evolution of the rock lizards: meiotic chromosome dynamics and spermatogenesis in diploid and triploid males of the genus *Darevskia*. *Genes (Basel)* 2017;8(6).pii:E149. DOI: 10.3390/genes8060149. PMID: 28538689.
24. Moens P.B., Earnshaw W.C. Anti-topoisomerase II recognizes meiotic chromosome cores. *Chromosoma* 1989;98(5):317–22. PMID: 2558860.
25. Matveevsky S.N., Pavlova S.V., Atsaeva M.M. et al. Dual mechanism of chromatin remodeling in the common shrew sex trivalent (XY1Y2). *Comp Cytogen* 2017;11(4):727–45. DOI: 10.3897/CompCytogen.v11i4.13870. PMID: 29114363. PMID: PMC5672328.
26. Jamsai D., O'Bryan M.K. Mouse models in male fertility research. *Asian J Androl* 2011;13(1):139–51. DOI: 10.1038/aja.2010.101. PMID: 21057516.
27. Feng C.A., Spiller C., Merriner D.J. et al. SOX30 is required for male fertility in mice. *Sci Rep* 2017;7(1):17619. DOI: 10.1038/s41598-017-17854-5. PMID: 29247201.
28. Solari A.J. Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* 1980;81(3):315–37. PMID: 7192619.
29. Martin R.H. Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2008;16(4):523–31. PMID: 18413061.
30. Tempest H.G. Meiotic recombination errors, the origin of sperm aneuploidy and clinical recommendations. *Syst Biol Reprod Med* 2011;57(1–2):93–101. DOI: 10.3109/19396368.2010.504879. PMID: 21204593.
31. De Vries M., Ramos L., de Boer P. Immunofluorescent characterization of meiotic recombination in human males with variable spermatogenesis. *Andrology* 2013;1(2):262–73. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2012.00039.x. PMID: 23413139.
32. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO Press, 2010.
33. Патент на изобретение № 2328736/10.07.2008. Бюл. № 19. Курило Л.Ф. Способ цитологической диагностики нарушения сперматогенеза. [Patent RUS № 2328736/10.07.2008. Bull. № 19. Kurilo L.F. Method of cytogenetic diagnosis of spermatogenesis violation. (In Russ.)]. Доступно по: <http://www.freepatent.ru/patents/2328736>. Ссылка активна на 20.02.2018.
34. Sun F., Kozak G., Scott S. Variation in meiotic recombination frequencies among human males. *Hum Genet* 2005;116(3):172–8. DOI: 10.1093/humrep/deh335. PMID: 15578224.
35. Tang W.H., Jiang H., Ma L.L. et al. Detection of spermatozoa in the testicular tissue of non-obstructive azoospermia patients: cell suspension examination versus histopathology. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2013;19(1):68–71. PMID: 23469666.
36. Miyamoto T., Minase G., Shin T. et al. Human male infertility and its genetic causes. *Reprod Med Biol* 2017;16(2):81–8. DOI: 10.1002/rmb2.12017. PMID: 29259455.
37. Gardner R.J.M., Sutherland G.R., Grant R. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. 4th ed. Oxford University Press, 2011. 648 p.

Вклад авторов

О.Л. Коломиец: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;
М.А. Лелекова: получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи;
А.А. Кашинцова: получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи;
Л.Ф. Курило: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи;
Е.Е. Брагина: получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи;
В.Б. Черных: получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи;
М.Ю. Габлия: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
И.В. Виноградов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа;
И.И. Витязева: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа;
С.В. Боголюбов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа;
В.Е. Спангенберг: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи.
Все авторы участвовали в обсуждении полученных результатов и редактировании текста рукописи.



Authors' contributions

O.L. Kolomiets: developing the research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing;
M.A. Lelekova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme;
A.A. Kashintsova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme;
L.F. Kurilo: developing the research design, analysis of the obtained data, article writing;
E.E. Bragina: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;
V.B. Chernykh: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme;
M.Yu. Gabliya: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;
I.V. Vinogradov: developing the research design, obtaining data for analysis;
I.I. Vityazeva: developing the research design, obtaining data for analysis;
S.V. Bogolyubov: developing the research design, obtaining data for analysis;
V.E. Spangenberg: developing the research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing.
All authors participated in the discussion of the results and the text of the manuscript editing.

ORCID авторов

O.Л. Коломиец: <https://orcid.org/0000-0002-1915-0039>
M.A. Лелекова: <https://orcid.org/0000-0003-1467-253X>
A.A. Кашинцова: <https://orcid.org/0000-0001-9715-381X>
Л.Ф. Курило: <https://orcid.org/0000-0003-3603-4838>
Е.Е. Брагина: <https://orcid.org/0000-0002-8422-4962>
М.Ю. Габлия: <https://orcid.org/0000-0002-8176-2597>
И.В. Виноградов: <https://orcid.org/0000-0001-7469-3952>
И.И. Витязева: <https://orcid.org/0000-0002-7916-02-12>
С.В. Боголюбов: <https://orcid.org/0000-0003-1974-5005>
В.Е. Спангенберг: <https://orcid.org/0000-0002-6623-9124>

ORCID of authors

O.L. Kolomiets: <https://orcid.org/0000-0002-1915-0039>
M.A. Lelekova: <https://orcid.org/0000-0003-1467-253X>
A.A. Kashintsova: <https://orcid.org/0000-0001-9715-381X>
L.F. Kurilo: <https://orcid.org/0000-0003-3603-4838>
E.E. Bragina: <https://orcid.org/0000-0002-8422-4962>
M.Yu. Gabliya: <https://orcid.org/0000-0002-8176-2597>
I.V. Vinogradov: <https://orcid.org/0000-0001-7469-3952>
I.I. Vityazeva: <https://orcid.org/0000-0002-7916-02-12>
S.V. Bogolyubov: <https://orcid.org/0000-0003-1974-5005>
V.E. Spangenberg: <https://orcid.org/0000-0002-6623-9124>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке в рамках научных проектов № 16-04-01447 и № 17-00-00430 (17-00-00429 КОМФИ) и бюджетного финансирования по договору № 0112-2016-0008, с использованием оборудования ЦКП ОБН РАН «Генетический полиморфизм».

Financing. The study was performed with the financial support within the framework of scientific projects №№ 16-04-01447, 17-00-00430 (17-00-00429 COMFR) and budget financing under the contract № 0112-2016-0008, using equipment of CCU DBS RAS "Genetic polymorphism".

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 01.12.2017. **Принята к публикации:** 21.12.2017.

Article received: 01.12.2017. **Accepted for publication:** 21.12.2017.