Цитогенетические и молекулярно-генетические методы исследования в диагностике бесплодия

Зав. лаборатории вспомогательных репродуктивных технологий,
канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Сомова О.В.

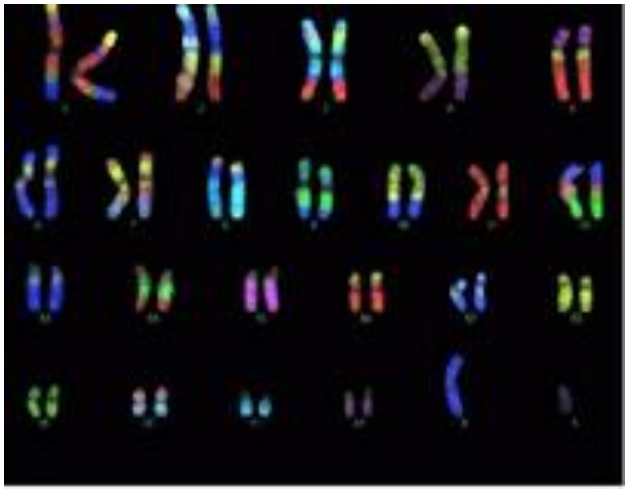
КЛИНИКА профессора ФЕСЬКОВА А.М.

Методы, применяемые в молекулярно-генетической лаборатории «Клиники профессора Феськова А.М.»

1. Цитогенетические
2. Молекулярно-цитогенетические
3. Молекулярно-генетические

КЛИНИКА профессора ФЕСЬКОВА А.М.

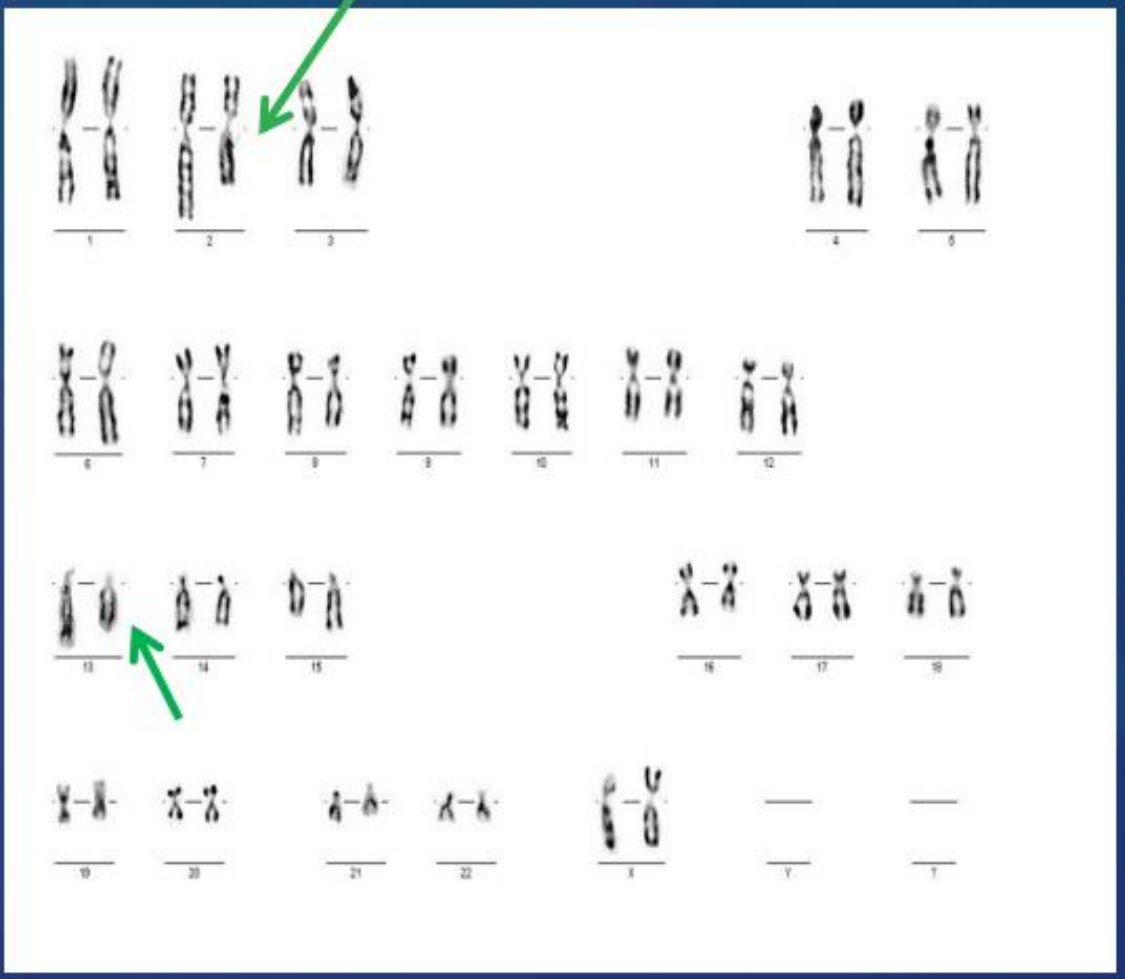
1. Цитогенетические методы – анализ кариотипа с применением дифференциального окрашивания хромосом



1. Лимфоциты периферической крови супружеской пары.
2. Ворсины хориона (пренатальная диагностика и выявление генетических причин замирания беременности).

3. Клетки амниотической жидкости (пренатальная диагностика – состояние плода, выявление врожденных и генетических заболеваний плода)

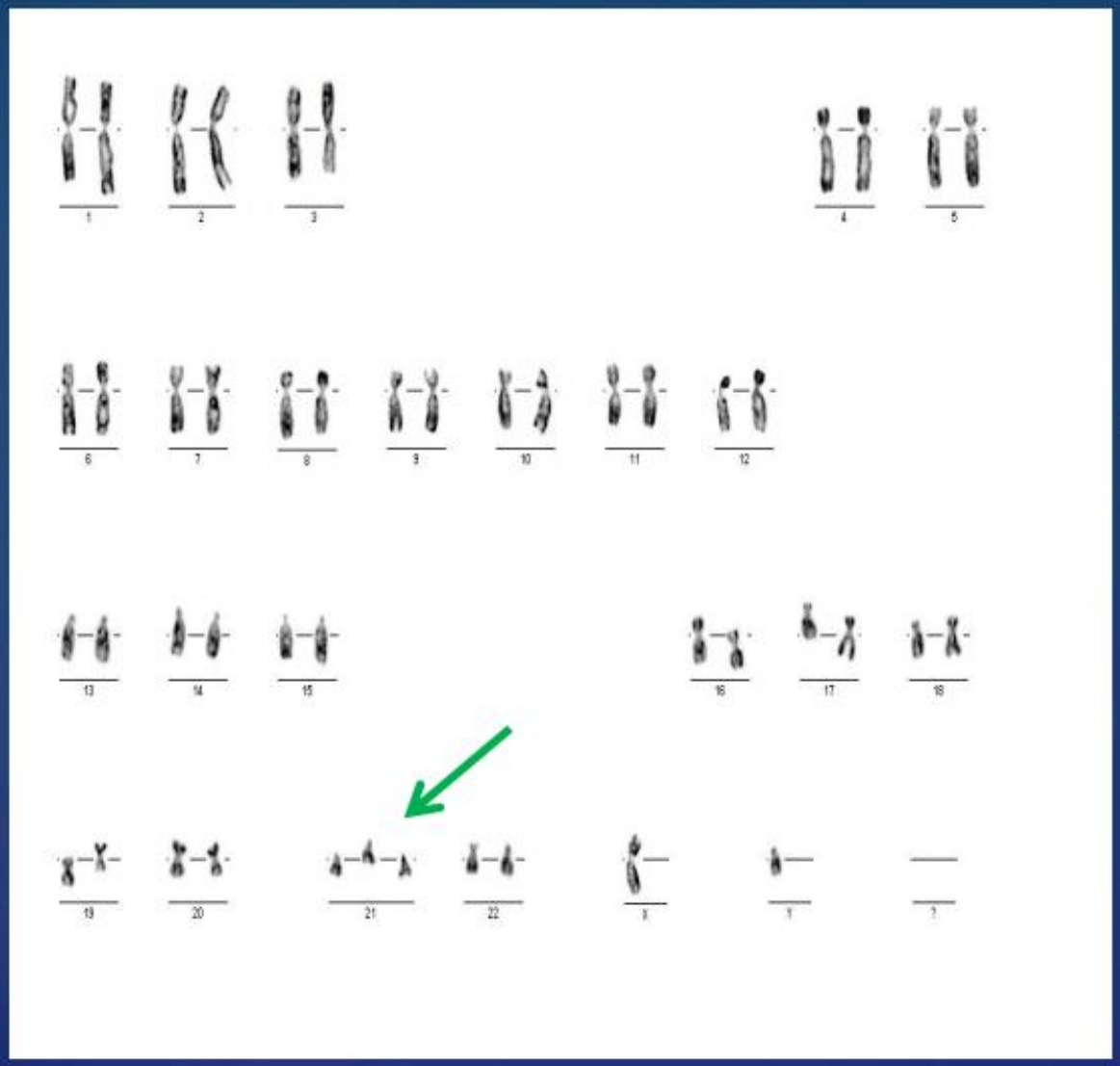
КЛИНИКА
профессора
ФЕСЬКОВА А.М.



Пациентка А: невынашивание беременности, 7 беременностей, замерших на ранних сроках в анамнезе. При анализе кариотипа у пациентки выявлена реципрокная транслокация.

46,XX,t(2:13)(q32;q33)

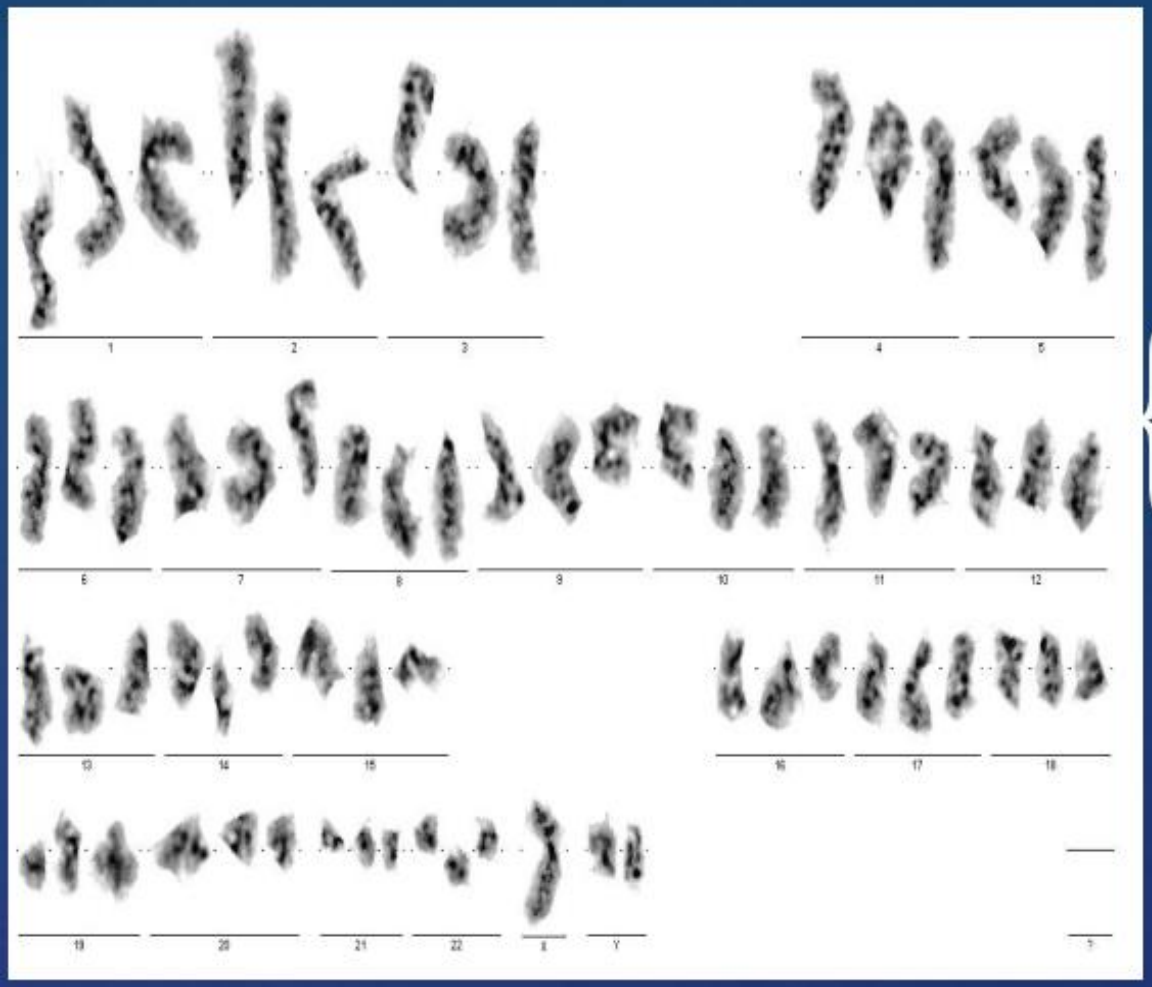
КЛИНИКА профессора ФЕСЬКОВА А.М.



Пациентка Б: возраст – 40 лет, беременность 18 недель. Проведен амниоцентез. Выявлена трисомия хромосомы 21 у плода (синдром Дауна)

47,XY,+21

КЛИНИКА профессора ФЕСЬКОВА А.М.



Пациентка В: возраст – 39 лет, замершая беременность в сроке 4-5 недель. Проведен анализ кариотипа ворсин хориона. Выявлен триплоидный набор хромосом.

69,XYY

КЛИНИКА профессора ФЕСЬКОВА А.М.

2. Молекулярно-цитогенетические методы

2.1 Оценка уровня анеуплоидий в сперме

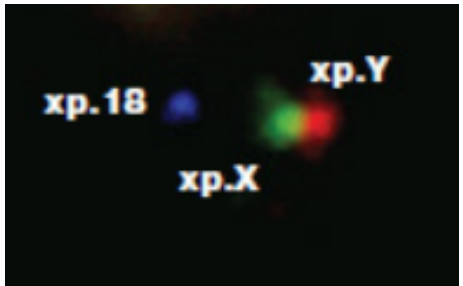
Одной из причин мужского бесплодия является генетический фактор. В связи с чем, становится актуальным изучение проблемы повреждений отцовского генома.

В настоящее время одним из немногих информативных подходов к анализу изменений набора хромосом в половых клетках является **метод флуоресцентной гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* (FISH).**

КЛИНИКА
профессора
ФЕСЬКОВА А.М.

Показаниями для данного исследования являются:

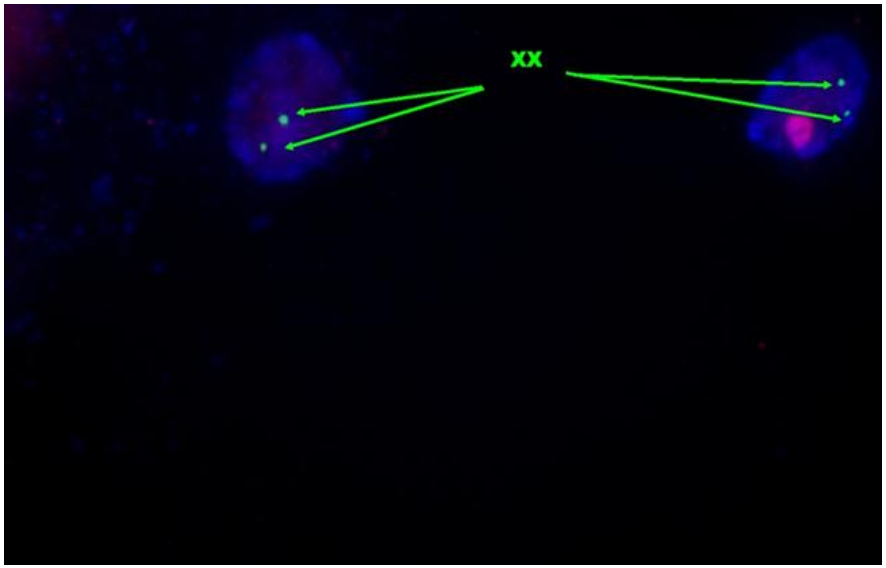
1.Тяжелые формы олиго-, астено-, тератозооспермии;
2. Первичное и вторичное мужское бесплодие неясного генеза;
3.Невынашивание беременности, выкидыши на ранних сроках, замершие беременности у супруги;
4. Мужчины старше 40 лет;
5. Пациенты, проживающие в неблагоприятных экологических регионах, либо работающие на вредных производствах.
6. Онкологические больные после курса химиотерапии.



КЛИНИКА
профессора
ФЕСЬКОВА А.М.

В норме уровень анеуплоидий в ядрах сперматозоидах не должен превышать 1,5 %

[Баранов В.С., Кузнецова Т.В., 2007]



КЛИНИКА
профессора
ФЕСЬКОВА А.М.

Выявленные нарушения

Рис.1. Патологическое ядро. Наличие двух половых (X Spectrum Aqua) и двух 18-х (18 Spectrum Orange) хромосом в ядре

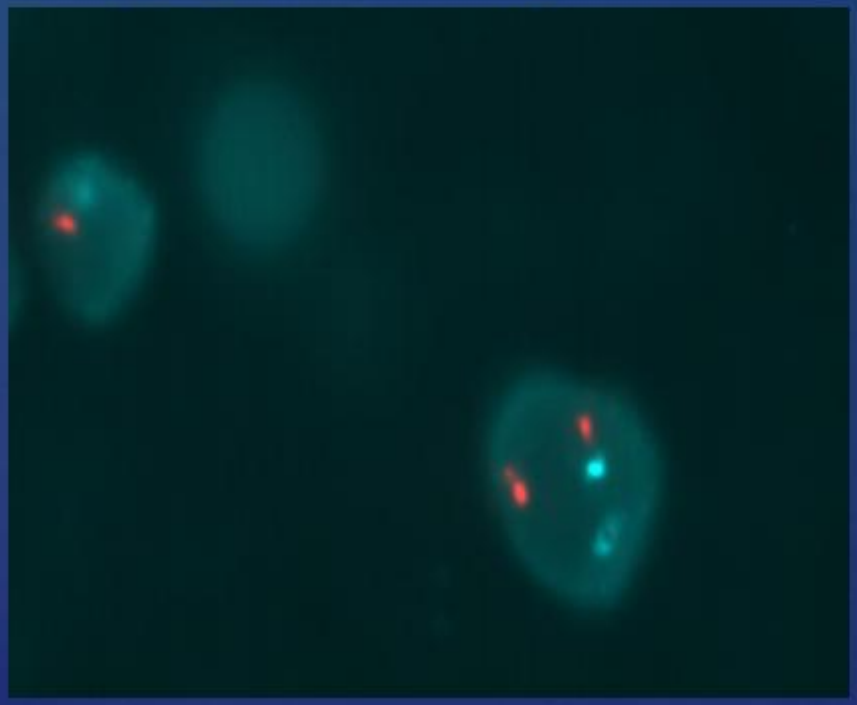
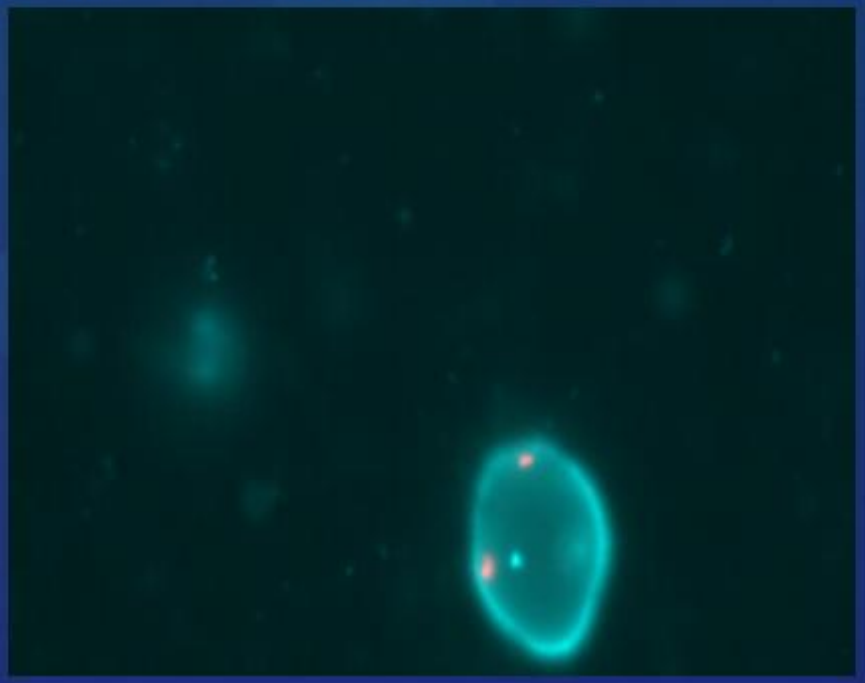


Рис.2. Патологическое ядро. Наличие одной половой (X Spectrum Aqua) и двух 18-х (18 Spectrum Orange) хромосом в ядре



КЛИНИКА профессора ФЕСЬКОВА А.М.

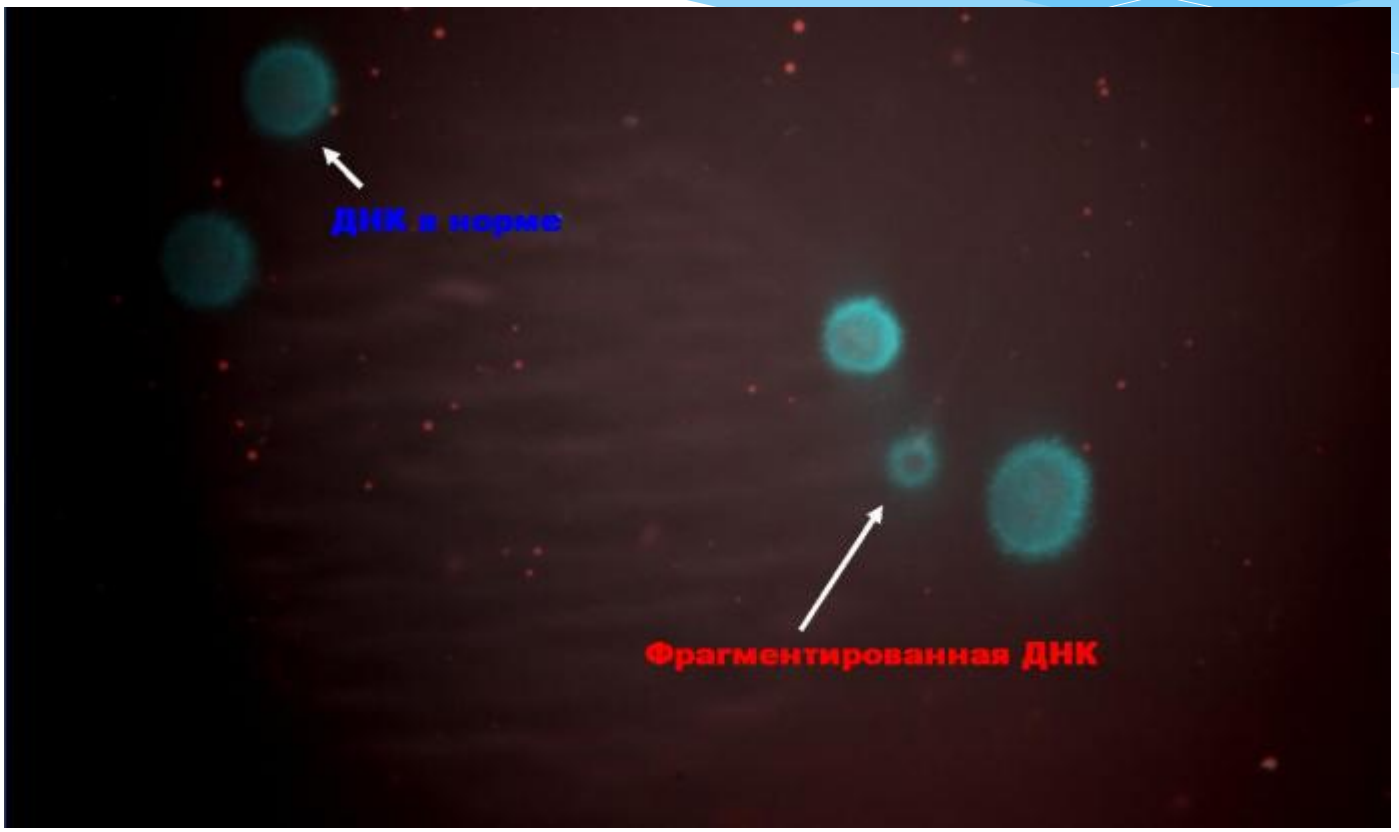
2.2 Фрагментация ДНК сперматозоидов

представляет собой одно- и двухцепочечные разрывы молекулы ДНК, возникающие в результате процессов изменения структуры хроматина в ходе сперматогенеза и апоптоза.

Является одной из возможных причин снижения репродуктивной функции мужчины.
В Клинике профессора Феськова А.М. применяется метод анализа Sperm Chromatin Dispersion (SCD).

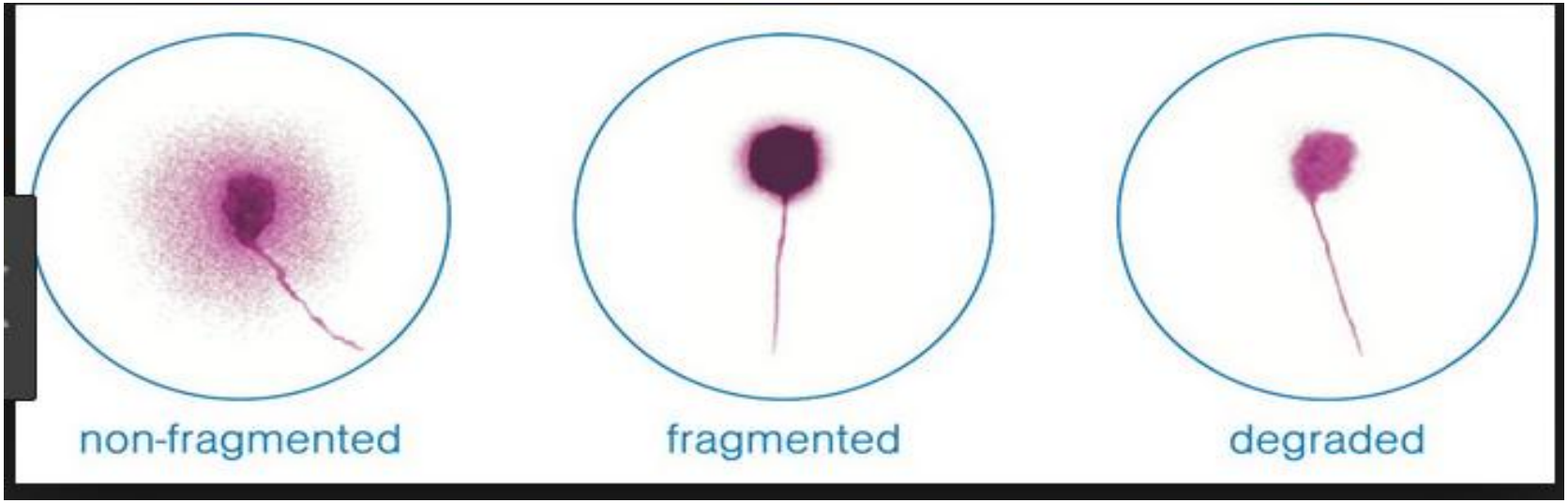
КЛИНИКА профессора ФЕСЬКОВА А.М.

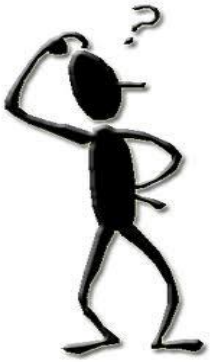
Определение степени фрагментации ДНК сперматозоидов с помощью метода дисперсии хроматина (SCD)



КЛИНИКА
профессора
ФЕСЬКОВА А.М.

Данные о возможном влиянии фрагментации ДНК сперматозоидов на ранние этапы эмбрионального развития, образование бластоцист, повышенный риск замирания беременности на раннем сроке и частоту спонтанных абортов противоречивы

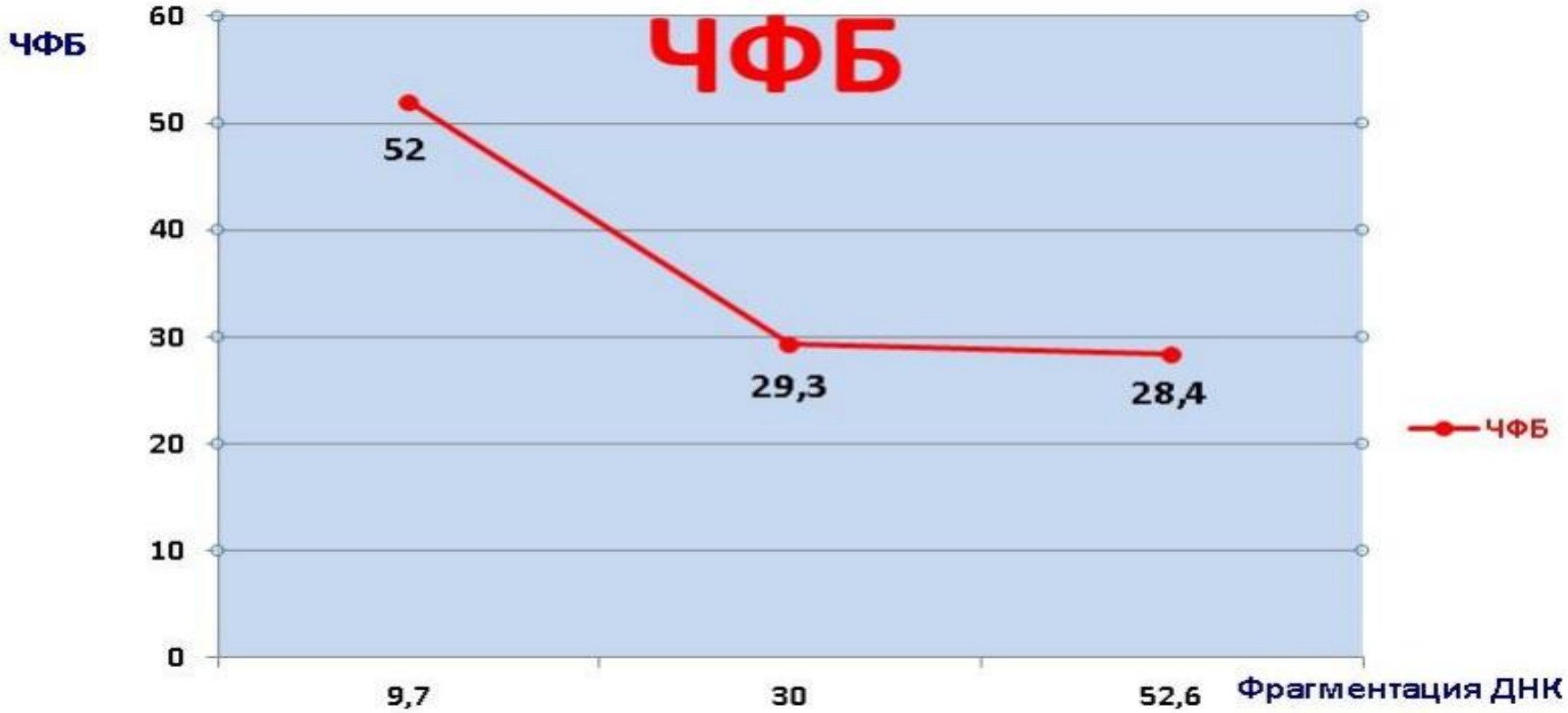




В норме индекс ДНК фрагментации (DFI) ≤ 27 %

КЛИНИКА профессора ФЕСЬКОВА А.М.

Влияние степени фрагментации ДНК сперматозоидов на частоту формирования бластоцист (ЧФБ) в программах ЭКО



КЛИНИКА
профессора
ФЕСЬКОВА А.М.

3. Задачи и возможности применения метода ПЦР

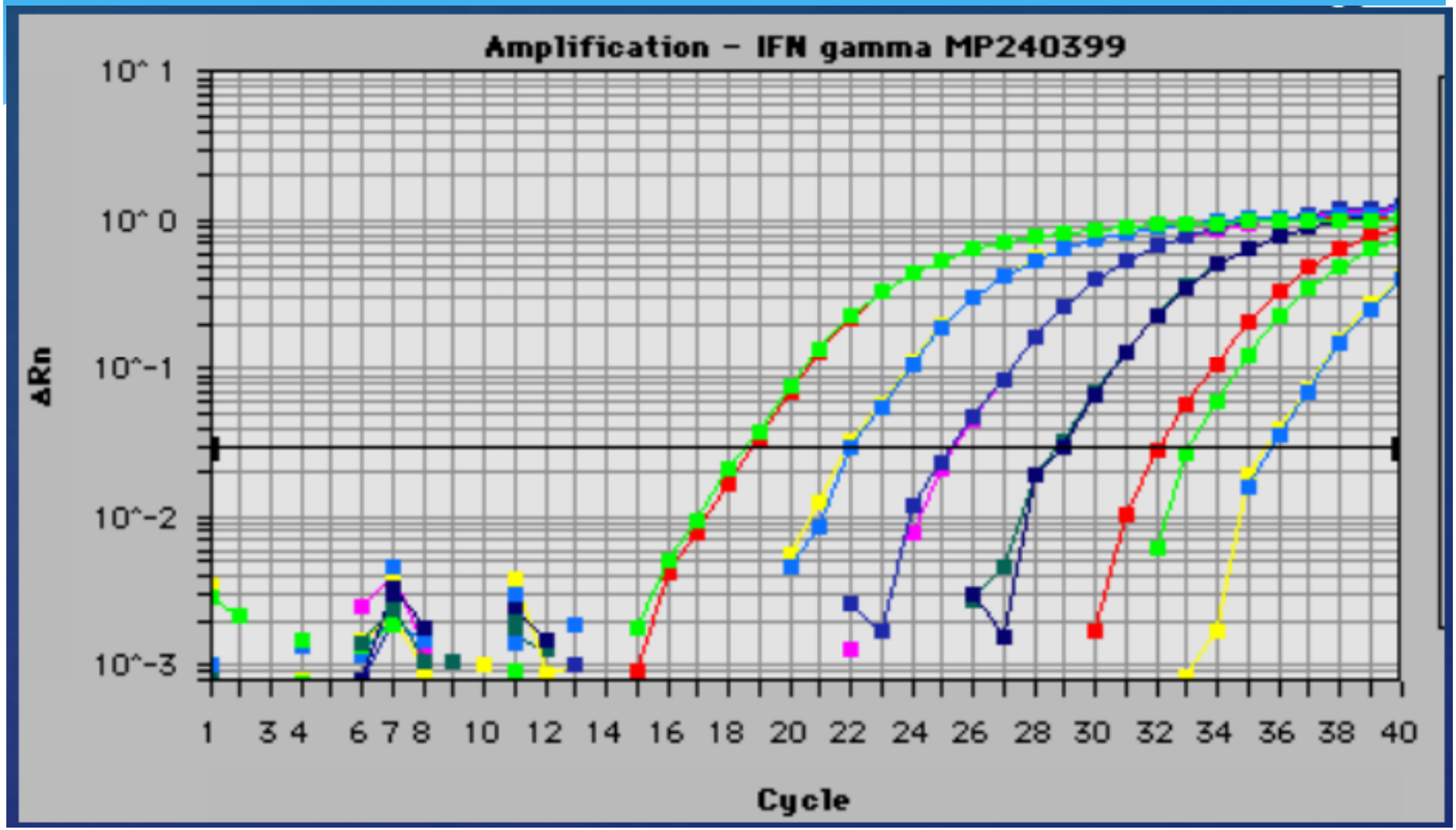
Генетическое тестирование доноров ооцитов (синдром ломкой Х-хромосомы, муковисцидоза и т.д.)

Генетическое обследование пациентов при наличии показаний в программах ЭКО/ИКСИ

Преимплантационная и пренатальная диагностика точечных генных мутаций (заболеваний)

Преимплантационная и пренатальная диагностика генома методом секвенирования нового поколения (NGS)

Визуализация real-time PCR



КЛИНИКА
профессора
ФЕСЬКОВА А.М.

Генетические исследования, проводимые в лаборатории ПЦР

* Диагностика мутации гена, отвечающего за развитие муковисцидоза **CFTR (delF508)**;
* Микроделеции **Y** хромосомы;
* Полиморфизмы генов фолатного цикла
* (**MTHFR C677T , MTHFR A1298C, MTRR A66G**);
* Пакет обследования «Мужское бесплодие»;
* Миссенс-мутация гена ингибина А **INHa1** Ala257Thr (769G→A);
* Пакет обследования «Тромбофилии»

КЛИНИКА
профессора
ФЕСЬКОВА А.М.

Пакет генетического тестирования при различных формах мужского бесплодия

- **Диагностика мутации гена CFTR** (delF508) ;

! *наличие у мужчины обструктивной азооспермии неясной этиологии является основанием для молекулярно-генетической диагностики гена CFTR*

- **Полиморфизмы гена рецептора ФСГ (FSHR)**: Asn680Ser (A1691G); Thr307Ala ;

- **Микроделеции Y хромосомы**: локусы sY84, sY127, sY86, sY134, sY254, sY255, SRY

CFTR - *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

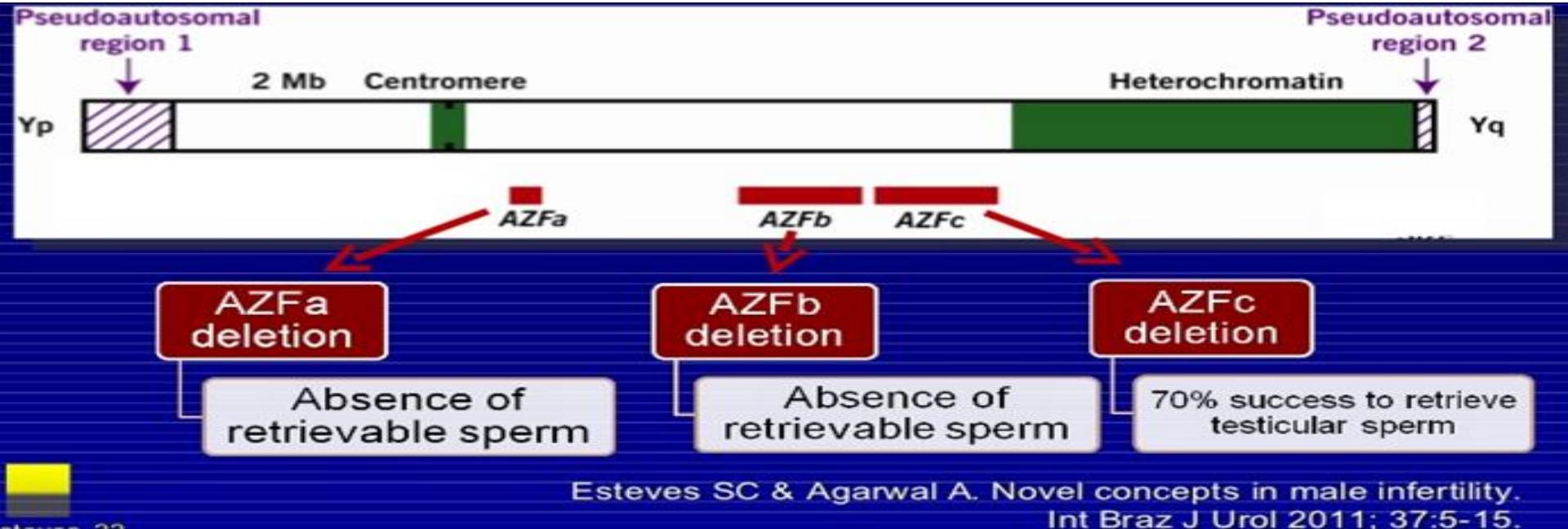
FSHR –*follicle-stimulating hormone receptor*

КЛИНИКА профессора ФЕСЬКОВА А.М.

Микроделеции Y хромосомы – это выпадение определенных участков Y хромосомы - AZF локуса (фактора азооспермии).

AZF локус находится в длинном плече Y-хромосомы (Yq11). Гены, расположенные в этом локусе, играют важную роль в процессе сперматогенеза.

У 20-30 % мужчин с необструктивной азооспермией и у 3-7 % мужчин с олигозооспермией выявляют отсутствие (делецию) AZF локуса



Пакет «Тромбофилии»

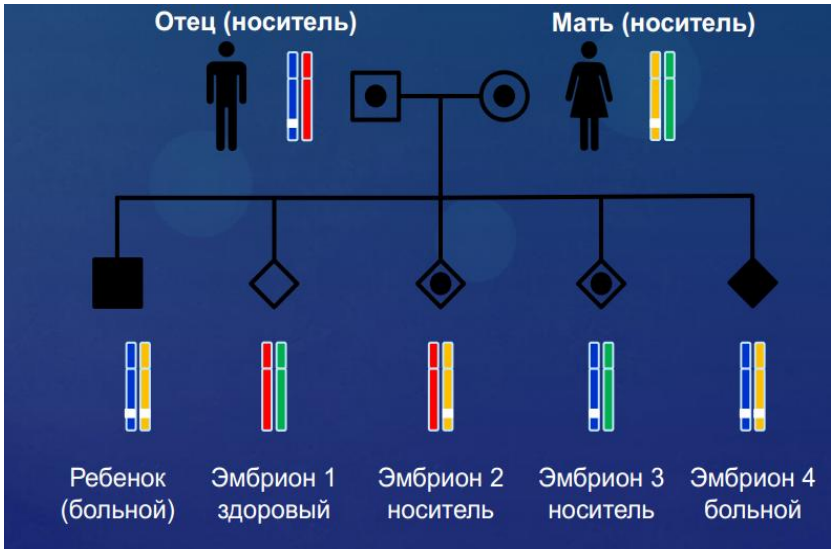
* Полиморфизм A313G гена GSTP1;
* Полиморфизм G20210A гена FII;
* Полиморфизм G1691A гена FV (Лейденская мутация) ;
* Полиморфизм генов, кодирующих ферменты фолатного цикла MTRR *и* MTHFR (C677T и A1298C)

MTHFR - *methylenetetrahydrofolate reductase*
MTRR - *methionine synthase reductase*

КЛИНИКА
профессора
ФЕСЬКОВА А.М.

- Подтвержденные цитогенетически нарушения кариотипа у одного из супруга или у обоих супругов;
- Рождение больного ребенка у пары;
- Носительство моногенного заболевания у супругов

Являются показанием к предимплантационной генетической диагностике эмбрионов



КЛИНИКА профессора ФЕСЬКОВА А.М.

Используемая литература:

Human Reproduction, Vol.26, No.12 pp. 3244–3248, 2011
Advanced Access publication on October 6, 2011 doi:10.1093/humrep/der328

human reproduction ORIGINAL ARTICLE *Andrology*

1

Intra-individual variation of the sperm chromatin structure assay DNA fragmentation index in men from infertile couples

K. Oleszczuk*, A. Giwercman, and M. Bungum

Reproductive Medicine Centre, Skåne University Hospital, Lund University, SE- 205 02 Malmö, Sweden

Springer JARG Journal of Assisted Reproduction and Genetics
springer.com | This journal | Toc Alerts | Submit Online | Open Choice

J Assist Reprod Genet. 2015 Jan; 32(1): 17–26. PMCID: PMC4294868
Published online 2014 Nov 13. doi: 10.1007/s10815-014-0374-1 PMID: 25392073

2

Sperm DNA fragmentation index and pregnancy outcome after IVF or ICSI: a meta-analysis

Zheng Zhang, Leilei Zhu, Hesong Jiang, Hai Chen, Yun Chen, and Yutian Dai

3. Цитогенетические методы диагностики хромосомных болезней. Методическое пособие для врачей / Гинтер Е.К. и др.– М. – 2009.
4. Иллариошкин С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование. – М.:МИА. – 2004.

Bach and Schlegel *Basic and Clinical Andrology* (2016) 26:15
DOI 10.1186/s12610-016-0043-6

Basic and Clinical Andrology

REVIEW ARTICLE Open Access

5 Sperm DNA damage and its role in IVF and ICSI

Phil Vu Bach and Peter N. Schlegel*

Journal of INTERNATIONAL MEDICAL RESEARCH
Journal of International Medical Research
2016, Vol. 44(6) 1283–1291
© The Author(s) 2016
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0300060516664240
imr.sagepub.com
SAGE

Research Report

Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcomes for Chinese couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection

Lin-Tao Xue[1,2], Rui-Xue Wang[1], Bing He[2], Wei-Ying Mo[2], Li Huang[2], Shi-Kai Wang[2], Xian-Bao Mao[2], Jun-Ping Cheng[2], Yue-Yue Huang[2] and RuiZhi Liu[1]

Human Reproduction, Vol.25, No.7 pp. 1713–1721, 2010
Advanced Access publication on May 24, 2010 doi:10.1093/humrep/deq098

human reproduction ORIGINAL ARTICLE *Infertility*

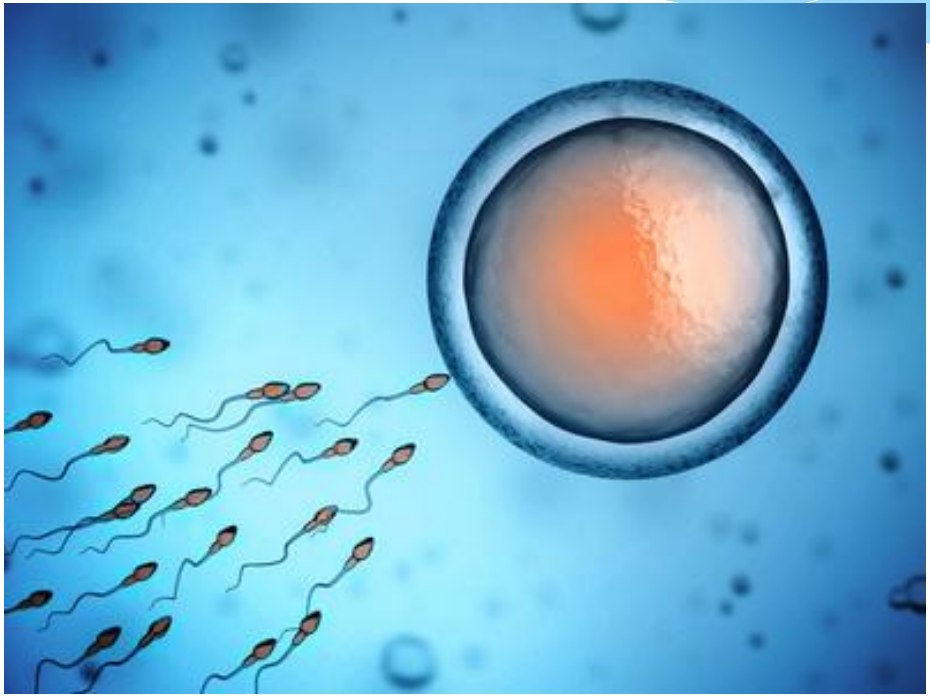
6 **Y chromosome microdeletions, sperm DNA fragmentation and sperm oxidative stress as causes of recurrent spontaneous abortion of unknown etiology**

J. Bellver[1,*], M. Meseguer[1], L. Muriel[2], S. García-Herrero[1], M.A.M. Barreto[1], A.L. Garda[3], J. Remohí[1], A. Pellicer[1], and N. Garrido[1]

[1]Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), University of Valencia, Plaza de la Policía Local, 3, 46015 Valencia, Spain [2]IVI Vigo, Plaza Francisco Fernández del Riego, 7, 36203 Vigo, Spain [3]IVI Murcia, Navegante Macías del Poyo, 5, 30007 Murcia, Spain

7. Ресурс Интернета

Спасибо за внимание!



КЛИНИКА
профессора
ФЕСЬКОВА А.М.