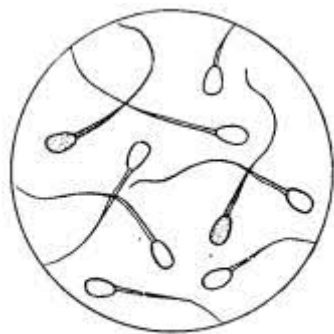


**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН
ІМЕНІ М.В.ЗУБЦЯ**

**ЦИТОЛОГІЧНІ МЕТОДИ
ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ
БУГАЇВ-ПЛІДНИКІВ
(МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ)**



Київ-Чубинське, 2018

УДК 636.293.2:[375.2; 576.316]

Д 43

Авторський колектив:

В. В. Дзіцюк, доктор сільськогосподарських наук;

О. Є. Гузеватий, кандидат біологічних наук.

Методичні рекомендації розглянуто і схвалено вченою радою Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН України (протокол № 11 від 23 жовтня 2018 р.).

Рецензенти:

Шаран М. М., доктор сільськогосподарських наук, професор, завідувач лабораторії біотехнології відтворення Інституту біології тварин НААН;

Кузєбний С. В., кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, заступник директора з наукової роботи Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН.

Дзіцюк В. В.

Д 43 Цитологічні методи дослідження сперматогенезу бугаїв-плідників
Методичні рекомендації / В. В. Дзіцюк, О. Є. Гузеватий. – Київ-
Чубинське, 2018. – 27 с.

Методичні рекомендації узагальнюють основні теоретичні положення і підходи щодо організації і проведення робіт з цитогенетичного аналізу статевих клітин плідників сільськогосподарських тварин.

УДК 636.293.2:[375.2; 576.316]

© Національна академія аграрних наук України, 2018
© Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН, 2018

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
1 Загальні уявлення про цитогенетику сперматогенезу.....	4
2 Методи дослідження сперматогенезу	7
2.1 Традиційна схема аналізу еякуляту племінних тварин....	7
2.2 Цитологічні методи.....	8
2.2.1 Кількісний каріологічний аналіз незрілих статевих клітин.....	8
3 Методика приготування препаратів хромосом із клітин сперматогенного ряду плідників.....	9
3.1 Приготування препаратів хромосом із клітин сім'яників плідника.....	9
3.2 Приготування препаратів хромосом із клітин сперматогенного ряду з еякулятів плідників.....	11
4 Аналіз хромосом сперматоцитів.....	13
5 Аналіз синаптонемних комплексів.....	22
6 Аналіз хромосомних наборів сперматозоїдів.....	23
6.1. Метод гетерологічного запліднення.....	23
6.2 Метод FISH.....	24
ЛІТЕРАТУРА.....	24

ВСТУП

Одним із основних завдань цитогенетики є визначення характеру аномалій каріотипу, встановлення можливих шляхів їх походження і пошук механізмів впливу дисбалансу хромосом чи їх структурних аберацій на процеси онтогенезу [1].

Хромосомні аберації є одним з основних етіологічних чинників, що призводять до неплідності у особин чоловічої статі. Хромосомний аналіз у випадках безпліддя самців проводився рядом дослідників [2, 3, 4]. Аналіз наукових публікацій свідчить, що часто за нормального соматичного каріотипу у тварини спостерігаються фенотипові вияви мутацій, причиною яких є хромосомні порушення в мейотичному каріотипі [5].

Дослідження сперматогенезу ссавців до недавнього часу мали в основному морфологічний чисто описовий характер, що не давало уявлення про механізми його визначення. Але актуальність питання і прямий зв'язок його з відтворною функцією спонукають до вивчення особливостей мейозу у сільськогосподарських тварин. І хоча під час гаметогенезу відбувається селекція гамет, все ж певна частка дегенерованих через наявність генних і хромосомних мутацій клітин еякулює, здатна до запліднення і стає джерелом виникнення неповноцінного, але життєздатного плоду.

Очевидно, що в цих випадках аналіз хромосом статевих клітин плідників не лише відкриває можливості для встановлення природи репродуктивної нестабільності плідників, а і дає змогу прояснити патогенез хвороб.

1. Загальні уявлення про цитогенетику сперматогенезу

Гаметогенез – процес утворення і диференціювання статевих клітин – має ключове значення в репродукції ссавців. Гаметогенез в організмі самців (сперматогенез) являє собою складний гормонально залежний і генетично детермінований процес [6, 7].

Процес дозрівання статевих клітин (гаметогенез) особливо привабливий для цитогенетичних досліджень завдяки наявності серії мітотичних поділів, мейотичній рекомбінації і редукційному поділу.

Всі статеві клітини ссавців беруть початок від первинних статевих клітин (ПСК) – гоноцитів. Походження ПСК досі остаточно не встановлено. Не викликає, однак, сумніву той факт, що ці клітини виникають значно раніше, ніж появляються зачатки гонад, тобто вони мають екстрагонадне походження. Встановлено, що гоноцити вперше виявляють ознаки статевого диморфізму в зачатках гонад. В процесі формування чоловічих гонад (сім'яників) сперматогонії оточуються клітинами ціломічного епітелію, утворюючи так звані «статеві тяжі», де вони перебувають в латентному стані до початку статевого дозрівання.

Велике практичне значення має визначення тривалості сперматогенезу і часу просування сперміїв через придатки сім'яників. Це дозволяє встановити строки, коли ті чи інші паратипові фактори впливають на якість еякуляту, визначити причини погіршення якості сперми, зробити правильні висновки про доцільність використання плідника. Тривалість сперматогенезу залежно від виду самця коливається від 35 днів у кнура до 75 днів у людини. У бугаїв – 61–63 дні. Дослідженнями доведено, що тривалість сперматогенезу є постійною видовою величиною.

За цей час ствові клітини сперматогенного ряду (сперматогонії), які перебувають в глибині сім'яних каналців, проходять тривалий шлях диференціювання до зрілих, практично позбавлених цитоплазми, сперматозоїдів, що містять гаплоїдний набір хромосом.

У процесі сперматогенезу розрізняють дві фази – тестикулярну і епідидимальну. Під час першої відбуваються основні етапи диференціювання сперматогоніїв у сперматиди, під час другої – завершується дозрівання сперматозоїдів. У результаті накопичення мукополісахаридів, холестерину, інших захисних білків, змінюються властивості зовнішніх мембран, сперматозоїди набувають здатності рухатись.

Тестикулярна фаза сперматогенезу включає два послідовних етапи: власне сперматогенез і сперміогенез. Тестикулярна фаза контролюється гормонами гіпофізу (фолікулостимулюючим і

лютеотропним) і власними гормонами сім'яників – тестикулярними андрогенами.

На I етапі сперматоцити I порядку проходять два послідовних мейотичних поділи. Вирішальним етапом гаметогенезу (сперматогенезу) є процес мейозу, під час якого відбуваються такі кардинальні для біології розвитку процеси як кон'югація гомологічних хромосом з утворенням синаптонемного комплексу, рекомбінація генетичного матеріалу гомологів шляхом взаємного обміну ідентичними хромосомними фрагментами (кросинговер), цитологічним проявом якого є хіазми. Всі ці процеси відбуваються у профазі I мейозу, в якій розрізняють такі цитологічні стадії як *лептотена*, *зиготена*, *пахітена*, *диплотена* і *діакінез*.

Далі йде метафаза I з утворенням сперматоцита або ооцита II порядку і метафаза I з утворенням гаплоїдних сперматид і метафаза II з утворенням гаплоїдних сперматид в мейозі. Із одного сперматоциту формується чотири сперматозоїди. Таким чином, із одного сперматоциту I порядку виникають 4 клітини (сперматиди) з гаплоїдним числом хромосом.

Всі процеси диференціювання відбуваються в стінках звивистих сім'яних каналців. При цьому клітини сперматогенного ряду перебувають безпосередньо в цитоплазмі клітин Сертолі, які забезпечують живлення сперматоцитів і сперматид.

Під час сперміогенезу гаплоїдні клітини – сперматиди – проходять ряд послідовних стадій диференціювання (фаза Гольджі, фаза ковпачка, акросомна фаза, фаза дозрівання). Вони втрачають цитоплазму, формують спеціальні органоїди (хвіст, шийку, акросому).

Особливо суттєві зміни відбуваються безпосередньо в ядрі клітин. ДНК в складі хромосом втрачає типову для соматичних клітин нуклеосомну організацію. Гістонові білки, характерні для функціонально активної ДНК, замінюються на кислі білки, багаті на аргінін і протаміни. Спіралізація ДНК досягає максимальної величини.

2. Методи дослідження сперматогенезу

Для гаметогенезу характерні числові і структурні порушення каріотипу, які якісно відрізняються від таких, що виникають в соматичному каріотипі.

Цитологічний аналіз сперматогенезу дозволяє простежити стадію мейозу, на якій стадії відбувається блокування формування гамет у плідника і встановити чинники, які можуть спричинити порушення хромосом.

Порушення сперматогенезу і сперміогенезу призводять до часткового або повного безпліддя у плідників. Останніми роками стало очевидно, що багато форм порушення фертильності плідників сільськогосподарських видів тварин обумовлені генетичними чинниками.

Точне визначення причин порушення фертильності нині набуває особливого значення, оскільки це дає змогу передбачити наслідки і уникнути матеріальних втрат у організації тваринницького виробництва.

Традиційно мейотичні хромосоми ссавців досліджують із біопсійного матеріалу чи матеріалу, отриманому після кастрації або забою тварин. Однак відбір матеріалу для досліджень пункцією сім'яника призводить до стресової ситуації у тварин, утворення гематом і, як наслідок, до погіршення їх спермопродуктивності. Це доцільно практикувати лише в особливих випадках для дослідження рідкісних видів тварин, для масового цитогенетичного моніторингу цей метод непридатний. До того ж, фрагмент сім'яника як біопсійний матеріал, який досліджується, може неадекватно відображати процеси, які відбуваються як в одному сім'янику, так і в обох.

2.1. Традиційна схема аналізу еякуляту племінних тварин

Традиційна схема аналізу еякуляту племінних тварин передбачає візуальне оцінювання сперми за зовнішніми ознаками (визначення об'єму, кольору, запаху, консистенції); мікроскопічне оцінювання якості сперми (визначення концентрації, оцінка якості за рухливою активністю, визначення співвідношення живих/мертвих та відсотку

патологічних форм сперматозоїдів). Іноді, за потреби, аналізується морфологія сперматозоїдів.

До аналізу еякуляту самця входить також визначення виживання спермійів поза організмом. Визначається тривалість збереження рухливості спермійів у годинах при 37°C до повного відмирання усіх спермійів. На підставі цих даних за спеціальною формулою визначають абсолютний показник виживаності сперматозоїдів. Якісна сперма бугая при розрідженні її у 16–32 рази повинна мати абсолютний показник виживання спермійів не нижче 1400.

Однак такий аналіз не дає відповіді на питання, які пов'язані з причинами низької концентрації сперми чи її низької запліднюючої здатності.

2.2. Цитологічні методи

2.2.1. Кількісний каріологічний аналіз незрілих статевих клітин

Як правило, дослідження хромосомного матеріалу із клітин сперматогенного ряду проводиться на клітинах біопсійного матеріалу сім'яників. Однак цей спосіб не знайшов широкого застосування не лише через необхідність проведення процедури біопсії, а і через низьку інформативність методу.

Одним із найдоступніших методів аналізу стану сперматогенезу у ссавців є кількісний каріологічний аналіз незрілих статевих клітин (ККАНСК). Успішними виявились дослідження цим методом еякульованих мейоцитів бугаїв [8].

Передумовою для розроблення даного методу було спостереження, що в еякуляті, окрім сперматозоїдів, міститься 2–4% незрілих статевих клітин, а при порушенні репродуктивної функції самця їх число значно зростає [9, 10].

Частка таких клітин у різних видів різна, зокрема у бугаїв вона складає 0,01% від числа сперматозоїдів [11].

Метод базується на визначенні числа клітин що перебувають на різних стадіях сперматогенезу шляхом їх підрахунку на цитогенетичних препаратах із еякуляту тварини.

На відміну від цитологічного аналізу біоптату сім'яника ККАНСК дозволяє детальніше проаналізувати стан сперматогенезу,

оскільки передбачає ідентифікацію всіх стадій як мейотичних так і перед- і постмейотичних. Зміна співвідношення клітин сперматогенного ряду дає змогу визначити стадії ділення чи диференціювання клітин, на яких сперматогенез виявився заблокованим.

В лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН проводиться дослідження сперми і аналіз еякульованих клітин сперматогенного ряду на сухоповітряних препаратах із нативних еякулятах бугаїв-плідників. Незрілі статеві клітини класифікуються в залежності від стадії розвитку так: сперматиди, первинні сперматоцити, резидуальні тільця, сперматогонії або певні сперматогенні клітини [12].

Визначається частка клітин кожної стадії від загальної кількості незрілих статевих клітин. Підрахунком виділяються сперматоцити на стадії передпахітеного етапу розвитку (клітини на стадіях прелептотени, лептотени і зиготени), пахітени, диплотени-діакінезу, метафази I і II, сперматоцити II порядку і сперматиди.

3. Методика приготування препаратів хромосом із клітин сперматогенного ряду плідників

3.1. Приготування препаратів хромосом із клітин сім'яників плідника

На початкових етапах виконання роботи приготування препаратів хромосом із сім'яників здійснювали за методом Еванса [13] з деякими модифікаціями.

Послідовність оброблення тканин, що досліджуються, така.

1. Невеликі шматочки сім'яника з цілими фрагментами сім'яних каналців обробляли гіпотонічним розчином (1%-й розчин цитрату натрію, протягом 5 хв.). Вирізали шматочок із середини сім'яника і клали його в чашку Петрі в 1%-й розчин цитрату натрію, закривали склянню кришкою і залишали за кімнатної температури 5–7 хв.

Враховуючи, що для вивчення клітин на стадіях лептотени, зиготени і пахітени краще використовувати клітини, які не оброблялись гіпотонією, матеріал для досліджень ділили на дві частини: одну поміщали в гіпотонічний розчин, другу відразу фіксували сумішшю спирту і оцтової кислоти.

2. З фіксованих у тотальному стані сім'яних канальців готували суспензію ізольованих статевих клітин, ретельно подрібнюючи тканину сім'яника. Суспензію додатково фіксували і висушували на предметному склі. Методика дала змогу працювати з дуже невеликим біопсійним шматочком сім'яника і вивчати будову хромосом на всіх етапах сперматогенезу. Методика дає змогу отримати якісні препарати як метафазних хромосом клітин на стадіях передмейотичного поділу, так і хромосом на всіх стадіях мейозу.

Для фіксації використовували суміш, приготовлену безпосередньо перед використанням. Суміш для фіксації складається з метилового чи етилового спирту, охолодженого до 0°C, і льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1. Шматочки сім'яника переносили у пробірку з фіксатором, обережно збовтували, зливали надосадову рідину і добавляли нову порцію фіксатора (так, щоб об'єм фіксатора перевищував об'єм тканини, що фіксується, не менше, ніж у 10 разів). Процедуру повторювали 5–6 разів.

Для розм'якшення тканин сім'яника і приготування суспензії ізольованих клітин використовували суміш льодяної оцтової кислоти і 50%-ї молочної кислоти у співвідношенні 4:1. Тканини сім'яника переносили у невеликі посудини і заливали їх сумішшю кислот. Слідкували, щоб об'єм рідини ледве перевищував об'єм тканин, інакше клітин буде мало.

Розпластання і висушування клітин робили на предметному склі. Для цього суміш статевих клітин переносили дозатором об'ємом до 0,5 мл на чисте предметне скло. Після нанесення на скло крапля розтікалась і в її центрі ставало помітним матове коло. На нього наносили краплю свіжоприготовленої суміші метилового спирту і льодяної оцтової кислоти. Після розтікання фіксатора по склу, але до початку його висихання, на препарат наносили 2–3 краплі абсолютного метилового спирту для збереження тонкої структури хромосом на стадіях зиготени–пахітени. На готовому препараті клітини розміщуються у формі правильного невеликого кола на тому місці, де на скло нанесли краплю суспензії. Препарати фарбували 2%-ним лактацетоорсеїном або фарбником Гімза.

3.2. Приготування препаратів хромосом клітин сперматогенного ряду з еякулятів плідників

Препарати мейотичних хромосом з еякулятів плідників для аналізу готували за методом Темпладо [14] з урахуванням особливостей еякулятів плідників різних видів.

Для цього 0,5 мл еякуляту вносили в центрифужну пробірку з гіпотонічним розчином (0,038 М розчин KCl), інкубували при 38°C протягом 30 хв., центрифугували (10 хв. при 300 g), осад ресуспендували охолодженим метанол–оцтовим фіксатором (3:1). Після трикратної зміни фіксатора з проміжним центрифугуванням (10–15 хв. при 300 g) до осаду добавляли 5 мл фіксатора і отриману суспензію наносили на предметні скельця. Препарати фарбували за Гімза і аналізували за допомогою світлового мікроскопу PZO при збільшенні в 1000 разів.

Для отримання препаратів синаптонемних комплексів нами було випробувано кілька методичних підходів: розпластання клітин [15], нанесення суспензії на препарат шляхом центрифугування [16], а також виявлення СК на препаратах, отриманих звичайним сухоповітряним способом [17].

Оптимальними визнали два способи приготування препаратів за методом розпластування клітин на краплі розчину сахарози [18].

За першим способом 0,5 мл еякуляту вносили в центрифужні пробірки з гіпотонічним розчином (0,038 М розчин KCl), інкубували за температури 38°C впродовж 30 хв., центрифугували (10 хв. при 300 g). На парафіновані предметні скельця наносили по дві краплі 0,2 М розчину сахарози. На ці дві краплі розкапували клітинну суспензію, яку через 1–2 хв. легким доторком предметного скла знімали. Фіксували в суміші водного розчину сахарози з параформальдегідом (рН 8,5) протягом 10 хв. Препарати фарбували 50%-вим водним розчином нітрату срібла в термостаті при 60°C протягом кількох (2-х і більше) годин у вологій камері з наступним дофарбовуванням фарбою Гімза. Стан фарбування контролювали під мікроскопом.

За другим способом [19] 5 мкл суспензії сім'яника у фізіологічному розчині обережно наносили на поверхню випуклого

меніска краплі (20 мкл) 0,2 М розчину сахарози на воскових скельцях. Воскові скельця готували, натираючи поверхню чистих знежирених скелець воском. Поєднання гіпотонічного шоку і дії сил поверхневого натягу розриває клітину і розпластує її вміст на поверхні скла. Через 2 хвилини до поверхні краплі обережно доторкувались чистим склом, яке попередньо натирали клаптиком вовняної матерії для електризації. Клітини, що прилипли до поверхні наелектризованого скла, фіксували у 4%-вому розчині параформальдегіду, рН 8,0–8,4, промивали у 0,4%-вому розчині фотофло (“Кодак”), рН 8,0 і висушували на повітрі. Препарати фарбували азотнокислим сріблом.

Стадії профазі мейозу визначали за методом Мозеса [20], проводячи диференційований аналіз гетерогенної популяції сперматоцитів з сім’яників (три стадії: рання, середня і пізня пахітена). Клітини на стадії зиготени і диплотени виключали з аналізу.

Для обліку структурних аномалій СК використовували клітини, що перебували на різних субстадіях пахітени, в яких вдавалось порахувати всі 29 аутосомних СК і виявити X-Y вісі [21].

Частку клітин сперматогенного ряду визначали у відсотках від суми підрахованих клітин сперматогенного ряду і сперматозоїдів на мазках із еякуляту. Крім того, на препаратах клітин із еякуляту чи біоптату сім’яника враховували соматичні клітини: епітеліальні і лейкоцити, а для біоптату – клітини Сертолі тощо [22].

Пошкодження СК описували відповідно до класифікації, запропонованої Allen et al. [23], поділяючи всі аномалії на три групи:

- 1) розриви СК і розриви окремих бокових елементів СК;
- 2) асинапсис;
- 3) багатоосеві конфігурації і неправильні парування.

Просторовим зближенням між XY-статевим бівалентом і СК вважали випадки їх взаємного розміщення на відстані меншій, ніж довжина XY-бівалента.

Враховуючи дані Forejt et al. [24] про не випадкові контакти X-Y-вісей з аутосомними СК, що містять те чи інше структурне порушення, кожен з пахітен характеризували також з точки зору наявності в ній асоціацій аутосомних СК.

4. Аналіз хромосом сперматоцитів

Аналіз хромосом сперматоцитів можливий на стадії пахітени. Для стадії пахітени характерним є чітко виражена хромомірна структура хромосом. За допомогою методів диференційного забарвлення в сперматоцитах можливо ідентифікувати кожен бівалент, виявити структурний поліморфізм і незначні структурні перебудови хромосом. На стадії пахітени можна виявити практично всі типи хромосомних аберацій [25].

Гетерозиготний стан хромосомних аберацій супроводжується утворенням характерних для кожного типу аномалій конфігурацій, тоді як гомозиготні перебудови виявляються лише в тому випадку, якщо вони різко змінюють морфологію хромосоми. Статевий бівалент (ХУ) утворює на стадії пахітени так званий статевий пухирець. Однак його детальний аналіз на світловому рівні утруднений внаслідок конденсованого стану. Реально дослідження статевого біваленту можливе лише на препаратах синаптемного комплексу – структурного компонента хромосомних бівалентів, який формується на стадії ранньої пахітени. В диплотені (стадія подвійних ниток) в міру роз'єднання гомологів в бівалентах візуалізуються хіазми. Характер розподілу хіазм в хромосомах і їх частота (середнє число на бівалент або на ядро) можуть бути різними і залежать від багатьох чинників, в тому числі і від наявності хромосомних перебудов. Для цитологічного аналізу зручною стадією є стадія діакінезу і метафази I. Біваленти на цій стадії класифікуються за формою, яка визначається розміром і морфологією хромосом, за числом і розміщенням хіазм [26].

Підрахунок числа уні-, бі- і мультивалентів, а також частоти локалізації хіазм є методами геномного аналізу і використовуються у рутинному аналізі мейозу [27].

Таким чином, аналіз хромосом в профазі сперматогенезу принципово можливий, хоча і має значні технічні і методичні труднощі.

Встановлено, що морфологія незрілих статевих клітин з еякулятів досліджених бугаїв не порушена і відповідає структурним характеристикам хромосом, препарати яких отримані з сім'яника. Як в

мейотичних клітинах сім'яника, так і в еякульованих мейоцитах хроматин має дифузний характер.

Результати проведених досліджень показали видову і індивідуальну специфіку наявності клітин сперматогенного ряду в еякулятах бугаїв.

У нормальних і здорових плідників, із нормальним каріотипом, за нашими даними, число клітин сперматогенного ряду в еякулятах невелике і не перевищує 150 тисяч в 1 мл еякуляту, що складає приблизно 0,01% від числа сперматозоїдів.

Нині використовується кілька підходів до аналізу хромосомних аберацій в мейозі. Аналізують біваленти в пахітені мейозу за рисунком хромомірної будови, за структурою синаптонемних комплексів реєструють число і структуру хромосом в метафазі I і II.

Вплив структурних хромосомних аберацій (ХА) на сперматогенез віріює, згідно даних літератури, в досить широких межах: від повної відсутності зрілих статевих клітин в еякуляті до нормального проходження процесу розвитку статевих клітин плідників. Слід відмітити, що у носіїв робертсонівських транслокацій сперматогенез і фертильність можуть бути не порушеними [28].

Наявність ХА не може не відобразитись на можливості проходження статевими клітинами мейотичних поділів і, перш за все, початку першого мейотичного поділу – профазі I мейозу. Цей тривалий багатостадійний етап мейозу характеризується такими важливими процесами гаметогенезу і онтогенезу як кон'югація гомологічних батьківських хромосом на стадії зиготени, кросинговер і рекомбінація генетичного матеріалу на стадії пахітени в статевих клітинах, що забезпечує біологічну різноманітність виду.

Завдяки використанню можливості дослідження незрілих клітин сперматогенного ряду (НКСП) в еякуляті ми змогли оцінити стан сперматогенезу плідників, зокрема проходження НКСП профазі I мейозу у бугаїв і жеребців.

При виконанні робіт по аналізу хромосомного матеріалу в спермі виявився ряд методичних труднощів, оскільки надто невелика кількість клітин сперматогенного ряду в еякуляті бугаїв і велика

кількість хромосом в клітині бугаїв і жеребців порівняно з аналогічним показником у людини значно ускладнює цитогенетичний аналіз.

Аналіз еякульованих клітин на різних стадіях, що передують мейозу і на стадіях власне мейозу дає змогу прослідкувати хід сперматогенезу бугаїв. Нами виявлена різна цитоморфологія попередників статевих клітин в еякуляті, що свідчить про перебування їх на різних стадіях мейотичного дозрівання.

Враховуючи цитофізіологію і ключові положення певних стадій сперматогенезу, нами проведена більш детальна ідентифікація клітин, розрізняючи сперматогонії, сперматоцити первинні в прелептотені, лептотені, зиготені, пахітені, диплотені, діакінезі – метафазі I (MІ), сперматозоїди.

Ми ідентифікували стадії лептотени, зиготени, пахітени (рис. 1).

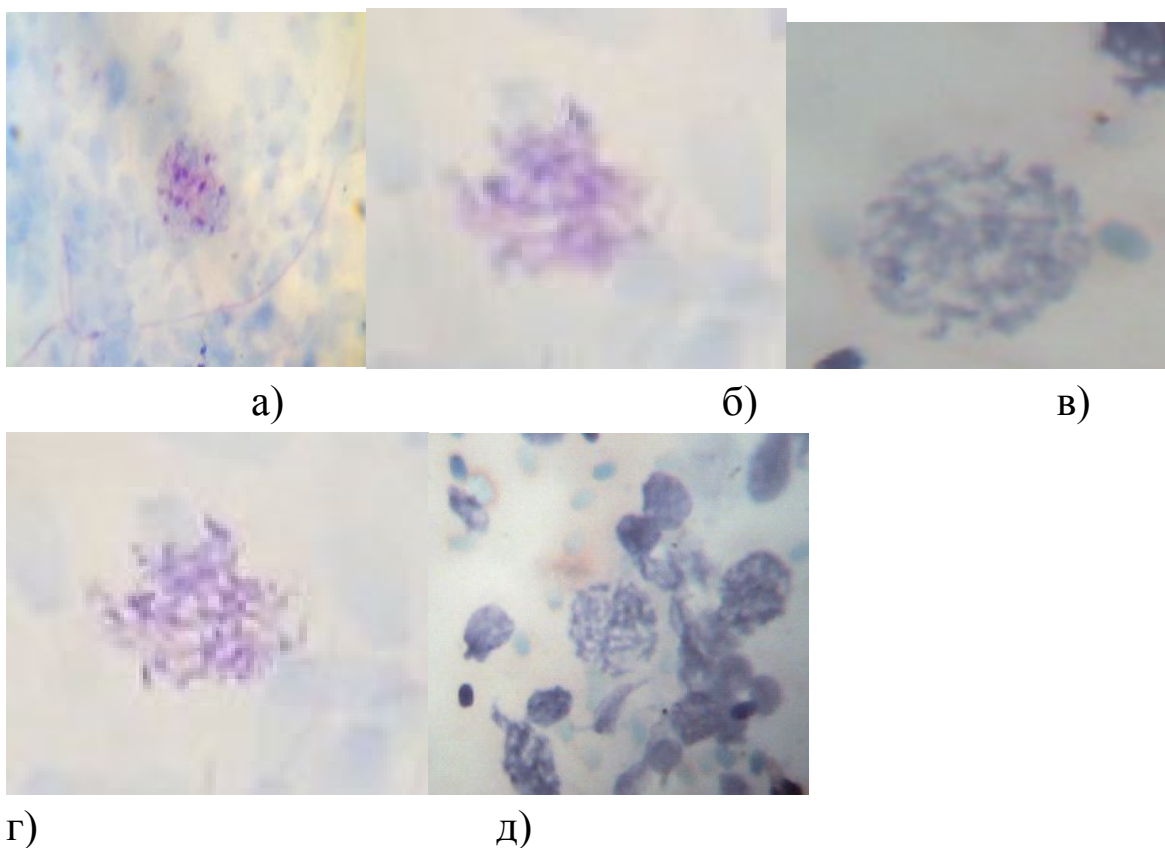


Рис. 2. Клітини сперматогенного ряду (препарати із еякулятів бугаїв): а) лептотена, б) зиготена, в) пахітена, г) диплотена, д) пахітена (препарат з біопсійного матеріалу сім'яника).

Збільшення: об. $\times 100$; ок. $\times 10$

Весь складний багатоетапний процес гаметогенезу зводиться до наступних ключових подій: після завершення проліферації сперматогонії в гонадах вступають в період передмейотичного синтезу ДНК, який відбувається в сперматоцитах I на *прелептотенних* стадіях.

Хромосоми в цей період ідентифікувати неможливо, оскільки вони представлені в різній ступені конденсації чи деконденсації. В міру завершення прелептотенної деконденсації сперматоцити I переходять на стадію *лептотени*, де в нитковидних хромосомах формуються вісі – попередники бокових елементів синаптонемного комплексу. Ця стадія також непридатна для каріотипування хромосом. Хромосоми на стадії лептотени мають виражену структуру – за їх довжиною з нерівномірними проміжками розміщені щільні потовщення – хромоміри. З першого погляду вони схожі на зернисту структуру хроматину, однак хромоміри мейотичних хромосом значно більші від хроматинових зернят.

Процес кон'югації гомологічних хромосом в біваленти на стадії *зиготени* здійснюється за допомогою формування бокових елементів синаптонемного комплексу і формування між ними центрального елемента синаптонемного комплексу. Синаптонемні комплекси розміщуються між гомологічними хромосомами, що кон'югують, утримують їх одну біля одної і сприяють правильному здійсненню процесу кросинговера [29].

На стадії *пахітени* хромосоми спіралізовані і краще розрізняються. Саме ця стадія є найбільш придатною для дослідження різних аномалій синапсису і структурних аберацій. За нашими даними, пахітенні сперматоцити в еякулятах бугаїв зустрічаються з частотою до 35% від загальної кількості виявлених незрілих статевих клітин. Інформативною в плані дослідження мейотичних хромосом і придатною для вияву аномалій хромосом є стадія пахітени – за боковими елементами синаптонемного комплексу. Однак, через особливості каріотипу великої рогатої худоби (багаточисельність і морфологічна подібність аутосом) проведення класичного пахітенного аналізу у бугаїв має певні труднощі.

На стадії пахітени синаптонемний комплекс повністю сформований в усіх бівалентах, відбувається кросинговер. Хромосомні біваленти на стадії пахітени конденсовані. Їх можна ідентифікувати за хромомірним рисунком і за СК бівалентів, тобто аналіз пахітенних бівалентів дає змогу виявити числові і структурні порушення.

Наступна стадія – стадія диплотени – в сперматогенезі коротка, а в оогенезі вона триває роками, характерна тим, що на ній хромосоми знову конденсуються. Ця стадія змінюється стадією діакінезу.

Число клітин на стадії діакінезу невелике і ідентифікувати хромосоми на цій стадії дуже важко. При спеціальному фарбуванні можна виявити лише дуже значні хромосомні перебудови, які ведуть до зниження числа хіазм.

Далі відбувається процес першого і другого ділень дозрівання. За ділень дозрівання порушується розходження хромосом і як наслідок цього – зміна їх числа.

В метафазі I і II виявляються хромосоми, однак ідентифікація їх утруднена.

Якщо прийняти до уваги твердження про еякуляцію більшої кількості незрілих клітин сперматогенного ряду як результату блоку мейозу на окремій стадії, то таким способом можна вирахувати проблемну зону мейотичного поділу. Іншими словами – наявність більшої кількості мейоцитів певної стадії розвитку і є інформативним показником стадії, на якій відбувся блок мейотичного поділу. Логічно припустити, що саме в результаті блоку однієї із стадій мейозу у плідника виявиться патологія спермопродуктивності, зокрема низька концентрація сперми. Наші дані показують, що концентрація сперміїв є інформативним параметром, асоційованим з проявом каріотипу з абераціями. В зв'язку з цим у бугаїв, які мають знижену концентрацію сперміїв (брак за концентрацією) доцільно обстежити соматичний каріотип.

Цитологічний аналіз еякульованих мейоцитів дає змогу простежити стадію мейозу, де відбувається блокування сперматогенезу у бугая з проблемою низької концентрації сперми і це

дає підстави вважати, що концентрація сперміїв є інформативним параметром, асоційованим з проявом каріотипу з абераціями.

Таким чином, блок мейозу може бути на всіх стадіях профазі I мейозу. Зокрема, блок на стадії зиготени проявляється в повній чи частковій втраті здатності до формування вісьових елементів хромосом і СК. На думку Popescu С. F. [30], такі порушення можуть бути проявом мутацій генів, які відповідальні за формування білкових вісьових елементів і СК, а можливо і порушенням процесу конденсації хромосом і ДНК-білкових взаємодій.

Так, у бугая Красавчика симентальської породи (ПОП “Дружба” Чернігівської області) (табл.) число незрілих клітин сперматогенного ряду виявилось на порядок нижчим за вищої концентрації сперми, ніж у інших досліджених бугаїв. В той же час у бугая Фанта 39032/385, з концентрацією сперми 800 млн./мл, число клітин сперматогенного ряду було значно більшим – до 3,8%. В даному випадку невисока концентрація сперми, очевидно, є наслідком блоку мейозу на одній із стадій, як це пояснює Templado et al. [31].

Число клітин мейотичного ряду в еякулятах бугаїв (ПОП “Дружба” Чернігівської області)

Кличка бугая	Концентрація сперми, млрд/мл	Рухливість сперміїв, балів	Частка клітин від числа сперміїв, %	Число клітин на різних стадіях сперматогенезу, % від загальної кількості мейоцитів			
				лепто-тена	зиготена-пахітена	інші стадії	не визначені
Красавчик 5061	1,2±0,7	8±2,1	0,00001±0,1	2,0±1,6	10,0±2,1	45,0±2,8	43,0±3,2
Александрій 2045	1,0±0,5	8±2,0	0,0008±0,1	3,0±1,7	11,0±1,9	34,0±2,5	52,0±2,4
Фант 39032/385	0,8±0,8	7±1,5	3,8±0,5	2,5±2,0	16,0±1,6	16,5±2,5	65,0±2,9
Фараон 73	1,0±0,6	8±1,6	0,0001±0,1	2,8±1,6	9,0±1,9	30,2±2,6	58,0±2,3

Серед клітин сперматогенного ряду у бугая Фанта 39032/385 частіше, ніж у інших бугаїв, зустрічаються клітини на ранніх стадіях профазі мейозу, що дає підстави зробити припущення про часткове блокування мейозу у цієї тварини на стадії лептотени.

Очевидно, що інформативними в плані дослідження мейотичних хромосом можуть бути стадія зиготени – за боковими елементами синаптонемного комплексу і в більшій мірі – біваленти і СК на стадії пахітени.

Окрім цього, співвідношення клітин, які на різних стадіях мейозу надійшли в еякулят, може бути показником тривалості цих стадій.

Найчастіше в досліджених еякулятах бугаїв зустрічались клітини на стадіях лептотени (до 18%) і пахітени (до 33%). Ці дані узгоджуються з результатами досліджень клітин сперматогенного ряду в еякуляті людини [32]. Ці стадії є найбільш тривалими.

Найкоротшими є стадії мейотичного поділу, на яких відбувається формування сперматоцитів, тому нам не вдалось виявити їх ні в одному з еякулятів, які досліджували. Не виявили і клітин на стадіях анафази I і телофази I. Як показує Л. Ф. Курило [32], ці стадії також дуже нетривалі. Ці дані узгоджуються з результатами інших дослідників [33].

У окремих плідників було виявлено більшу кількість клітин, які неможливо було ідентифікувати, що, на нашу думку, вказує на активність дегенеративних процесів в сперматогенному епітелії.

Порушення кон'югації хромосом в зиготені (в т.ч. формування синаптонемного комплексу – структури, необхідної для повноцінної кон'югації гомологічних хромосом), кросинговеру в пахітені, розходження гомологічних хромосом в диплотені призводить до часткового блоку сперматогенезу на ранніх стадіях профазі I мейозу і селекції неповноцінних гамет. Крім того, необхідно відмітити, що при виникненні структурних перебудов хромосом і їх впливу на сперматогенез можливо має значення і ефект положення, точкові мутації, міні-делеції і міні-дуплікації в одній чи обох точках розриву, в які можуть бути втягнуті гени, що беруть участь в регуляції тих чи інших етапів сперматогенезу.

Одним із механізмів, що порушує проходження сперматогенезу є порушення формування синаптонемного комплексу в зиготені і ранній пахітені профазі I мейозу [34].

Нормальна кон'югація гомологічних хромосом в мейотичних клітинах передбачає ефективний кросинговер (обмін ділянками) між гомологічними хромосомами і нормальне розходження останніх в анафазі мейозу. Якщо у тварини в соматичному каріотипі є структурна аберація, зокрема, наприклад, транслокація за Робертсонівським типом, то в мейозі формуються асинаптичні і гетеросинаптичні комплекси між негомологічними хромосомами і з залученням бівалента статевих хромосом. Взаємодія між гетеросинаптичними квадривалентами і XY-бівалентом призводить до порушення інактивації X-хромосоми, що сприяє синтезу продуктів певних генів. Транскрипція генів на стадії пахітени порушує мейотичний цикл і може бути причиною часткового блоку сперматогенезу тварин, які мають в соматичному каріотипі різні типи транслокаційних перебудов аутосом. Це може бути одним з пояснень причин і механізму блоку мейозу на певній стадії, внаслідок чого в еякулят надходять незрілі клітини, що зупинили свій розвиток саме на цій стадії.

З даних літератури очевидно, що профазі I мейозу є найбільш чутливою до чинників, які впливають на формування і диференціювання клітин сперматогенного ряду. Наряду з проходженням процесу формування сперміїв відбувається послідовна презиготична селекція клітин, яка відбувається завдяки дії незалежних і притаманних кожній стадії сперматогенезу механізмів блоку розвитку статевих клітин [35].

Наряду з цим Vaccetti et al. [36] на основі результатів своїх досліджень при аналізі Робертсонівської транслокації 14/22 зробили припущення, що наявність транслокації призводить не лише до порушення сперматогенезу на стадії диференціювання сперматоцитів, а і впливає на формування морфологічних структур зрілого спермія. Однак, очевидно, не слід однозначно стверджувати, що порушення нормального формування повноцінних сперматозоїдів є наслідком саме транслокацій хромосом в соматичному каріотипі. За даними

літератури рівновірогідною причиною може бути наявність інших первинних генних дефектів, які можливо задіяні в створенні умов для порушення проходження сперматогенезу в нормі [37].

Вивчення аномалій мейотичних хромосом у людини показало, що найзручнішою для дослідження різних аномалій синапсису і структурних аберацій, тобто для проведення „пахітенного аналізу хромосом” є стадія пахітени [38]. Пахітенні хромосоми більш спіралізовані і розрізняються [39].

У досліджених нами еякулятах бугаїв мейоцити на стадії пахітени зустрічаються з частотою 16–60%. Схожі дані були отримані Martin R. в дослідженні клітин сперматогенного ряду у людини [40].

Проте слід відмітити, що через особливості каріотипу великої рогатої худоби (багаточисельність і морфологічна подібність аутосом) проведення класичного пахітенного аналізу у бугаїв має певні труднощі навіть з використанням диференційного забарвлення АТ-специфічним флюорохромом Хехст 33258. Хромосоми на цій стадії, окрім статевих, які формують статевий міхурець, погано піддаються ідентифікації.

До 3% виявлених сперматоцитів перебувають на стадії лептотени, вони мають виражену структуру – можна розрізнити щільні потовщення – хромоміри.

Число виявлених сперматоцитів на стадії діакінезу невелике і ідентифікувати хромосоми на цій стадії дуже важко. Хромосоми на цій стадії дуже конденсовані, їх довжина, за даними Lewis-Jones I. et al. [41] не перевищує 2–3 мкм. При спеціальному фарбуванні можна виявити лише дуже значні хромосомні перебудови, які ведуть до зниження числа хіазм і явище повного чи часткового десинапсису, які проявляються в зниженні числа хіазм. Окрім того, відносні числа клітин на цих стадіях в еякулятах бугаїв дуже невисокі – до 0,5%. У багатьох тварин їх взагалі не вдалось виявити, а у бугая із зниженою концентрацією сперми (Фант 39032/385) частка таких клітин становила 2,2%.

5. Аналіз синаптонемних комплексів

Безпосереднє вивчення взаємозв'язку процесів кон'югації, розподілу хіазм и нерозходження хромосом представляє метод аналізу синаптонемних комплексів (СК). Останній є обов'язковим структурним елементом бівалентів на стадії пахітени [42].

Функціями СК є забезпечення кон'югації гомологічних хромосом в профазі I і іункція матриці для коректних міжхромосомних обмінів [43]. Донині детально не досліджено яким чином СК виконує ці функції. Проте СК визнається своєрідним скелетом мейотичної хромосоми, а його – перетворення відображенням поведінки гомологів в профазі I мейозу. Детально вивчені особливості формування осьових елементів СК на стадії лептотени, початок їх зближення і синапсису на стадії зиготени, синапсис і його корекція на стадії пахітени, а також десинапсис хромосом на стадії диплотени [44, 45].

Основний метод аналізу СК заключається в розпластанні мейотичних клітин на поверхні гіпотонічного розчину з наступним контрастуванням структур СК і його аналізом за допомогою світлового або електронного мікроскопа.

Завдяки співпадінню морфометричних характеристик більшості СК і відповідних їм метафазних хромосом є можливим ранжування СК у вигляді ідеограм [46].

Трудомісткість і потреба у електронній мікроскопії для детального аналізу СК не дозволяють впровадити цей метод в практику не лише цитологічного дослідження сільськогосподарських тварин, а і для медико-генетичного дослідження людей. У той же час можливість аналізу СК для встановлення причин порушень сперматогенезу переконливо доведена в роботах багатьох дослідників [47–50].

Встановлено, що асинаптичні і десинаптичні аномалії СК асоційовані зі збільшенням частоти гетероплоїдних сперматозоїдів [51, 52] і навіть з повним блоком сперматогенезу [53, 54].

Очевидно, що виявлення мейотичних аномалій при аналізі СК важливо для пошуку специфічних чинників, що впливають на ключові події мейозу. Однак значні труднощі в організації таких досліджень суттєво знижують практичну інформативність аналізу СК.

6. Аналіз хромосомних наборів сперматозоїдів

Найточнішою оцінкою частоти і спектру хромосомних аномалій, що виникають в мейозі, є дослідження хромосомного набору зрілих гамет. Як відомо, хроматин в головці сперматозоїда упакований дуже щільно, і візуалізація окремих хромосом можлива лише після запліднення. Донині не відомі способи цитохімічні обробки сперматозоїдів, яка дала б змогу отримувати в умовах *ін вітро* препарати з розпластаними хромосомами, придатними для цитогенетичного аналізу.

Для подолання цієї перепони використовується кілька підходів.

6.1. Метод гетерологічного запліднення

Одним із об'єктивних методів, що дають змогу проводити прямий аналіз хромосомного набору сперматозоїдів ссавців, зокрема бугая, базується на заплідненні *in vitro* звільнених від оболонки яйцеклітин золотистого хом'ячка сперматозоїдами бугая і наступній візуалізації хромосом чоловічого пронуклеуса [55, 56].

Після обробки через 12–14 годин запліднених яйцеклітин колхіцином препарати фіксують і диференціально фарбують.

За допомогою цього методу можливо встановити низку важливих відомостей про частоту і спектр аномалій хромосом в мейозі в нормі, а також про вплив різних чинників на сперматогенез.

Трудомісткість, висока собівартість, необхідність значних матеріальних затрат суттєво лімітують можливість широкого використання методу гетерологічного запліднення.

Новий імпульс дослідженням в цьому напрямку може дати метод мікроін'єкції сперматозоїдів плідника в яйцеклітини – метод ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection). Розроблений з метою лікування безпліддя людини цей метод можна застосувати і для дослідження хромосом чоловічого пронуклеуса після запліднення, здійсненого шляхом ін'єкції сперматозоїда плідника безпосередньо в яйцеклітину лабораторної миші [57, 58].

Метод виключає селекцію сперматозоїдів за їх запліднюючою здатністю, що підвищує вірогідність детекції хромосомних аномалій.

6.2. Метод FISH

Відносно новим прямим методом аналізу числових хромосомних аномалій в зрілих сперматозоїдах ссавців є метод гібридизації *in situ*. Переваги методу заключаються в швидкості аналізу і масштабності досліджень.

Однак його можливості обмежені реєстрацією числових аберацій окремих хромосом чи їх локусів, які маркуються ДНК-зондами. Спроби вивчити структурні аберації не мали успіху. Зазвичай використовується мультиплексна (двох-, триколірна) FISH з прицентромірними ДНК-зондами, яка дає змогу відрізнити істинну дисомію за якоюсь хромосомою від диплоїдії [59].

Суттєве значення для FISH-аналізу сперматозоїдів мають як способи підготовки препаратів (деконденсація хроматину в головці спермія), так і умови проведення гібридизації. Для підвищення ефективності гібридизації розроблені різні варіанти деконденсації хроматину [60–62].

Таким чином, сучасні цитогенетичні методи досліджень, доповнені за необхідності методами ДНК-аналізу, дають змогу проводити вивчення геномних і хромосомних мутацій на різних етапах сперматогенезу ссавців і достатньо точно встановлювати механізми їх виникнення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Dyban, A. P. Cytogenetics of mammalian embryonic development / A. P. Dyban, V. S. Baranov. – Oxford : Clarendon Press, 1987. – 362 p.
2. Кулешов, Н. П. Частота возникновения и судьба хромосомных аномалий популяции человека : дисс. ... д-ра биол. наук / Н. П. Кулешов. – М., 1979. – 301 с.
3. Popescu, C. F. Les chromosomes meiotiques du eueuf (Bos taurus) / C. F. Popescu // Ann. Genet. Sci. Anim. – 1971. – № 3. – P. 125–143.
4. Templado, C. An analysis of human sperm chromosome aneuploidy / C. Templado, C. Merquez, S. Munne // Cytogenetic and Cell Genetics. – 1996. – Vol. 74. – P. 196–200.
5. Switonski, M. The nature of the 1;29 translocation in cattle as revealed by synaptonemal complex analysis using electron microscopy / M. Switonski, I. Gustavsson, L. Ploen // Cytogenet. Cell Genet. – 1987. – Vol. 44. – P. 103–111.
6. Райцина, С. С. Гормональный контроль сперматогенеза у млекопитающих / С. С. Райцина // Сперматогенез и его регуляция ; под ред. Л. О. Даниловой. – М. : Наука, 1983. – С. 3–61. [Raytsina S. S. Hormonal control of

spermatogenesis in mammals. In: *Spermatogenesis and its regulation*. Ed. L. O. Danilova. Moscow : Nauka, 1983. – P. 3–61 (in Russ.)].

7. Курило, Л. Ф. Генетические и эпигенетические механизмы регуляции, хронология и динамика сперматогенеза у млекопитающих / Л. Ф. Курило, М. И. Штаут // *Андрология и генитальная хирургия*. – 2015. – № 16 (1). – С. 31–40. [Kurilo L. F., Shtaut M. I. Genetic and epigenetic mechanisms of regulation, chronology and dynamics of spermatogenesis of mammals. *Andrologiya i genitalnaya khirurgiya Andrology and Genital Surgery*, 2015;16(1):31–40 (in Russ.)].

8. Кузнецова, Т. В. Цитогенетический анализ клеток сперматогенного ряда у быков : материалы 1 Всес. конф. по цитогенетике с.-х. животных / Т. В. Кузнецова, А. В. Родионов, Л. И. Ежова. – М., 1985. – С. 53–54.

9. Sperling, K. Meiotic studies of the ejaculated seminal fluid of humans with normal sperm count an oligospermia / K. Sperling, R. Kaden // *Nature*. – 1971. – V. 232. – P. 481.

10. Templado, C. Three cases of low chiasma frequency associated with infertility in man / C. Templado, S. Marina, J. Egozque // *Andrologia*. – 1976. – V. 8. – P. 285–289.

11. Кузнецова, Т. В. Мейотические хромосомы эякулированных сперматоцитов быков / Т. В. Кузнецова, А. В. Родионов, А. Ф. Яковлев // *Цитология*. – 1990. – Т. 32, № 2. – С. 181–187.

12. Кариологический анализ состава незрелых половых клеток эякулята / Л. Ф. Курило, И. А. Любашеская, В. П. Дубинская, Т. Н. Гаева // *Урология и нефрология*. – 1993. – № 2. – С. 45–47.

13. Evans, H. J. Cytological mapping of human chromosomes. Results obtained with quinacrine fluorescence and acetic-saline-Giemsa techniques / H. J. Evans, K. Bucton, A. T. Sumner // *Chromosoma*. – 1973. – V. 35. – P. 310–325.

14. Improved technique for the study of the meiosis in ejaculates: results of the first 50 consecutive cases / C. Templado, F. Vidal, J. Navarro, J. Egozcue // *Human Genet.* – 1986. – Vol. 72. – P. 275–277.

15. Дыбан, А. П. Метод приготовления мейотических и митотических хромосом из семенников млекопитающих / А. П. Дыбан // *Цитология*. – 1970. – Т. XII, № 5. – С. 687–689.

16. Chromosome analysis of epididymal and testicular sperm in azoospermic patients undergoing ICSI / G. Palermo, L. Colombero, J. Hariprashad, P. Schlegel, Z. Rosenwaks // *Hum Reprod.* – 2002. – V. 17. – P. 570–575.

17. Tres, L. L. Electron microscopy of t-allele synaptonemal complex discloses no inversions / L. L. Tres, R. P. Erickson // *Chromosoma*. – 1982. – V. 84. – P. 457.

18. Evans, H. J. Cytological mapping of human chromosomes. Results obtained with quinacrine fluorescence and acetic-saline-Giemsa techniques / H. J. Evans, K. Bucton, A. T. Sumner // *Chromosoma*. – 1973. – V. 5. – P. 310–325.

19. Holm, P. B. Ultrastructural characterization of meiotic prophase. A tool in the assessment of radiation damage in man / P. B. Holm, S. W. Rasmussen, D. Wettstein // *Mutat. Res.* – 1992. – V. 95. – P. 45–59.

20. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). III. Quantitative evaluation / M. J. Moses, G. H. Statton, T. M. Gambling, C. F. Starmer // *Chromosoma*. – 1977. – V. 60. – P. 345.
21. Holm, P. B. Ultra structural characterization of meiotic prophase. A tool in the assessment of radiation damage in man / P. B. Holm, S. W. Rasmussen, D. Wettstein // *Mutat. Res.* – 1992. – V. 95. – P. 45–59.
22. Pathak, S. Sterility in hybrid cattle / S. Pathak, N. Kinffer // *Cytogen. Genet.* – 1979. – V. 24. – P. 52.
23. Allen, J. W. Synaptonemal complex damage induced by clastogenic and antimetabolic chemicals : implications for non-disjunction and aneuploidy / J. W. Allen, J. B. Gibson, P. A. Pooman // *Mutat. Res.* – 1988. – V. 201, № 2. – P. 313–324.
24. Forejet, J. X-inactivation and its role in male sterility / J. Forejet // *Chromosomes Today*. – 1984. – V. 8. – P. 17–30.
25. Хвостова, В. В. Перестройки хромосом в мейозе / В. В. Хвостова, Г. Л. Ячевская // *Цитология и генетика мейоза*. – М. : Наука, 1975. – С. 232–262.
26. Кикнадзе, И. И. Микроскопическая морфология мейоза и его модификаций / И. И. Кикнадзе, Л. В. Высоцкая // *Цитология и генетика мейоза ; под ред. В. В. Хвостовой, Ю. Ф. Богданова*. – М. : Наука, 1975. – С. 15–41.
27. Balanced translocation (10;13) in a father, ascertained through the study of meiosis in semen, and partial trisomy 10q in his son / Miro R. [et al.] // *Hum. Genet.* – 1980. – Vol. 53, № 2. – P. 179–182.
28. Templado, C. An analysis of human sperm chromosome aneuploidy / C. Templado, C. Merquez, S. Munne // *Cytogenetics and Cell Genetics*. – 1996. – V. 74. – P. 196–200.
29. Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males / P. Vidal, C. Templado, K. Navarro, J. Egozcue // *Human. Genet.* – 1982. – V. 60. – P. 301–304.
30. Popescu, C. F. A study of meiotic chromosomes in bulls carrying the 1/29 translocation / C. F. Popescu // *Ann. biol. anim. biochim. biophys.* – 1978. – V. 18, № 213. – P. 383–389.
31. Templado, C. Improved technique for the study of the meiosis in ejaculates: results of the first 50 consecutive cases / C. Templado, F. Vidal, J. Navarro, J. Egozcue // *Human Genet.* – 1986. – V. 72. – P. 275–277.
32. Курило, Л. Ф. Генетический контроль за половой дифференцировкой и некоторыми этапами репродукции человека / Л. Ф. Курило. – М. : Уфа, 2000. – С. 51–66.
33. Diemer, T. Developmental and genetic disorders in spermatogenesis / T. Diemer, C. Desjardins // *Hum. Reprod.* – 1999. – V. 5, № 2. – P. 120–140.
34. Структура наследственной патологии половой системы при обследовании пациентов с нарушением репродукции / Л. Ф. Курило, Л. В. Шилейко, Е. В. Мхитарова и др. // *Медико-генет. консультирование в профилактике наследственных болезней : тез. докл. Рос. науч.- практ. конф.* – М., 1997. – С. 154–155.
35. Коломиец, О. Л. СК – как индикатор хромосомной изменчивости : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03. 00.15 / О. Л. Коломиец. – М., 1998. – 61 с.

36. Baccetti, B. Infertile spermatozoa in a human carrier of robertsonian translocation 14;22 / B. Baccetti, S. Capitani, G. Collodel // *Fertil. Steril.* – 2002. – V. 78, № 5. – P. 1127–1130.
37. Jose Luis Quintana de la Rosa. Chromosomal translocation 3;22 in an infertile man / Jose Luis Quintana de la Rosa, Avila Cavazos R. et al. // *Fertil. Steril.* – 2001. – V. 75, № 6. – P. 1222–1223.
38. Chromosome analysis of epididymal and testicular sperm in azoospermic patients undergoing ICSI / G. Palermo, L. Colombero, J. Hariprashad, P. Schlegel, Z. Rosenwaks // *Hum. Reprod.* – 2002. – V. 17. – P. 570–575.
39. Богданов, Ю. Ф. Кариотипирование на основе синаптонемных комплексов и применение этого метода в цитогенетике / Ю. Ф. Богданов, О. Л. Коломиец // *Генетика.* – 1985. – V. 21, № 15. – С. 793–802.
40. Martin, R. Chromosomal analysis of human spermatozoa / R. Martin // *J. of In Vitro Fert. a Embr. Transf.* – 1990. – V. 7, № 4. – P. 196.
41. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities / I. Lewis-Jones, N. Aziz, S. Seshadri, A. Douglas, P. Howard // *Fertil. Steril.* – 2003. – V. 79. – P. 212–215.
42. Loidl, J. Cytological aspects of meiotic recombination / J. Loidl // *Experientia.* – 1994. – Vol. 50, № 3. – P. 285–294.
43. Heyting, C. Synaptonemal complexes: structure and function / C. Heyting // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 1996. – Vol. 8, № 3. – P. 389–396.
44. Carpenter, A. T. C. The recombination nodule story – seeing what you are looking at / A. T. C. Carpenter // *Bioessays.* – 1994. – Vol. 16. – P. 69–74.
45. Solari, A. J. Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes / A. J. Solari // *Chromosoma.* – 1980. – Vol. 81, № 3. – P. 315–337.
46. A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents / C. Templado [et al.] // *Hum. Genet.* – 1981. – Vol. 59, № 4. – P. 345–348.
47. A new synaptic anomaly: irregular synaptonemal complexes / J. Navarro [et al.] // *Hum. Genet.* – 1986. – Vol. 72, № 3. – P. 272–274.
48. Lange, R. Analyses of meiotic chromosomes in testicular biopsies of infertile patients / R. Lange, W. Krause, W. Engel // *Hum. Reprod.* – 1997. – Vol. 12, № 10. – P. 2154–2158.
49. Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males / F. Vidal [et al.] // *Hum. Genet.* – 1982. – Vol. 60, № 1. – P. 301–304.
50. Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa of normal fertile men and those with severe male factor detected by in situ hybridization / L. Bernardini [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 1997. – Vol. 3, № 5. – P. 431–438.
51. Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescent in situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthen oteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection / M. G. Pang [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14, № 5. – P. 1266–1273.

52. Hulten, M. Low chiasmata count and other meiotic irregularities in two infertile 46,XY men with spermatogenic arrest / M. Hulten, R. Eliasson, K. G. Tillinger // *Hereditas*. – 1970. – Vol. 65, № 2. – P. 285–290.
53. Meiotic studies in series of 1100 infertile males / J. Egozcue [et al.] // *Hum. Genet.* – 1983. – Vol. 65, № 2. – P. 185–188.
54. Martin, R. H. Detailed method for obtaining preparations of human sperm chromosomes / R. H. Martin // *Cytogen. Cell Genet.* – 1983. – Vol. 35, № 4. – P. 252–256.
55. Rudak, E. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa / E. Rudak, P. A. Jacobs, R. Yanagimachi // *Nature*. – 1978. – Vol. 274, № 5674. – P. 911–913.
56. Федорова, И. Д. Цитогенетическая характеристика эякулированных клеток сперматогенного ряда человека : автореф. дис. ... канд. биол. наук / И. Д. Федорова. – СПб., 2004. – 16 с.
57. Цитогенетический анализ сперматозоидов человека с использованием внутрицитоплазматической инъекции в ооциты мыши / И. Д. Федорова [и др.] // *Генетика*. – 2005. – Т. 41, № 3. – С. 310–317.
58. Intracytoplasmic sperm injection of human spermatozoa into mouse oocytes: a useful model to investigate the oocyte-activating capacity and the karyotype of the human spermatozoa / A. Rybouchkin [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1995. – Vol. 10, № 5. – P. 1130–1135.
59. Spriggs, E. L. Aneuploidy in human sperm: result of two- and three-colour fluorescence in situ hybridisation using centromeric probes for chromosomes 1, 12, 15, 18, X and Y / E. L. Spriggs, A. W. Rademaker, R. H. Martin // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1995. – Vol. 71, № 1. – P. 47–53.
60. Estimate of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm / F. Z. Bischoff, D. D. Nguyen, K. J. Burt [et al.] // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1994. – Vol. 66, № 4. – P. 237–243.
61. Holms, J. M. Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization / J. M. Holms, K. H. Martin // *Hum. Genet.* – 1993. – Vol. 91, № 1. – P. 20–24.
62. Mercier, S. Analysis of chromosome equipment in spermatozoa of a 46,XY/47,XY/+8 male by means of multicolour fluorescence in situ hybridization: confirmation of a mosaicism and evaluation of risk for offspring / S. Mercier, J. L. Bresson // *Hum. Genet.* – 1997. – Vol. 99, № 1. – P. 42–46.