

## Клинический случай преодоления бесплодия, обусловленного мужским фактором (глобозооспермией 1-го типа), методом интрацитоплазматической инъекции морфологически нормального сперматозоида с активацией ооцитов $Ca^{2+}$ -ионофором

В. В. Литвинов<sup>1,2</sup>, А. Н. Сулима<sup>2,3</sup>, М. А. Харитонов<sup>1</sup>, А. А. Клепуков<sup>1</sup>, И. Ю. Ермилова<sup>1</sup>, Ю. Ю. Маклыгина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ООО «ЭКО центр», клиника «АльтраВита»; Россия, 117186 Москва, ул. Нагорная, 4А;

<sup>2</sup>ООО «Медицинская клиника «Ваш Доктор»»; Россия, Республика Крым, 295017 Симферополь, ул. Зои Жильцовой, 4;

<sup>3</sup>Медицинская академия им. С. И. Георгиевского – подразделение ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского»; Россия, Республика Крым, 295051 Симферополь, б-р Ленина, 5/7

**Контакты:** Владимир Валентинович Литвинов lvv33@yandex.ru

Представлен случай лечения супружеского бесплодия, вызванного мужским фактором – тяжелой формой тератозооспермии (тотальной глобозооспермией 1-го типа). Данная патология встречается крайне редко (у 0,1 % пациентов с андрологическими заболеваниями). Глобозооспермия 1-го типа – недостаточно изученное тяжелое нарушение сперматогенеза, которое приводит к абсолютному мужскому бесплодию. В описанном клиническом случае для лечения были использованы вспомогательные репродуктивные технологии, а именно метод интрацитоплазматической инъекции морфологически нормального сперматозоида с активацией ооцитов  $Ca^{2+}$ -ионофором А23187. Наступившая беременность и последующие роды протекали благоприятно.

**Ключевые слова:** глобозооспермия,  $Ca^{2+}$ -ионофор, экстракорпоральное оплодотворение, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида, интрацитоплазматическая инъекция морфологически нормального сперматозоида, беременность, клинический случай

**Для цитирования:** Литвинов В. В., Сулима А. Н., Харитонов М. А. и др. Клинический случай преодоления бесплодия, обусловленного мужским фактором (глобозооспермией 1-го типа), методом интрацитоплазматической инъекции морфологически нормального сперматозоида с активацией ооцитов  $Ca^{2+}$ -ионофором. Андрология и генитальная хирургия 2019;20(3):00–00.

DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-3-00-00

### The clinical case of infertility treatment caused by male factor (globozoospermia type 1) by the intracytoplasmic morphologically normal sperm injection with activation of the oocytes by $Ca^{2+}$ -ionophore

V. V. Litvinov<sup>1,2</sup>, A. N. Sulima<sup>2,3</sup>, M. A. Kharitonova<sup>1</sup>, A. A. Klepukov<sup>1</sup>, I. Yu. Ermilova<sup>1</sup>, Yu. Yu. Maclygina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ECO-Center, AltraVita Clinic; 4A Nagornaya St., Moscow 117186, Russia;

<sup>2</sup>Medical Clinic Vash Doctor; 4 Zoi Zhiltsovoy St., Simferopol 295017, Republic of Crimea, Russia;

<sup>3</sup>S.I. Georgievsky Medical Academy – structural unit of the V.I. Vernadsky Crimean Federal University; 5/7 Lenina Blvd, Simferopol 295051, Republic of Crimea, Russia

A case of infertility treatment in couple with a male factor, the severe form of teratozoospermia (total globozoospermia (type 1)) was presented. This pathology is extremely rare (0.1 % at andrological patients). Globozoospermia (type 1) is an insufficiently studied disease and is a severe disorder of spermatogenesis that leads to 100 % of male infertility. Assisted reproductive technologies with using of intracytoplasmic morphologically normal sperm injection and the activation of oocytes – by  $Ca^{2+}$ -ionophore А23187 in a man with globozoospermia (type 1) helped in the treatment of infertility in matrimony. Pregnancy and childbirth proceeded favorably.

**Key words:** globozoospermia,  $Ca^{2+}$ -ionophore, in vitro fertilization, intracytoplasmic sperm injection, intracytoplasmic morphologically normal sperm injection, pregnancy, clinical case

**For citation:** Litvinov V. V., Sulima A. N., Kharitonova M. A. et al. The clinical case of infertility treatment caused by male factor (globozoospermia type 1) by the intracytoplasmic morphologically normal sperm injection with activation of the oocytes by  $Ca^{2+}$ -ionophore. Андрология и генитальная хирургия = Andrology and Genital Surgery 2019;20(3):00–00.

## Введение

Первые в СССР экспериментальные исследования оплодотворения яйцеклетки человека *in vitro* проведены Григорием Николаевичем Петровым в 1955–1966 гг. в Крымском медицинском институте на кафедре гистологии и эмбриологии (руководитель Б.П. Хватов) [1]. Позже, в 1969 г., эмбриолог Роберт Эдвардс (Robert Edwards) и гинеколог Патрик Стептоу (Patrick Steptoe) из Кембриджа (Великобритания) заявили о разработке методики *in vitro* fertilization (оплодотворения яйцеклетки вне организма). Через 9 лет после неоднократных попыток оплодотворения полученных ооцитов в естественных циклах, их оплодотворения, дробления и переноса эмбриона в полость матки одна из них успешно завершилась наступлением беременности и родами 25 июля 1978 г. (Великобритания, Олдем, клиника Борнхолл). Так началась эра вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) в мире.

В России первый ребенок, зачатый путем оплодотворения яйцеклетки *in vitro*, появился в 1986 г. благодаря группе проф. Б.В. Леонова, в которую входили гинекологи Е.А. Калинина и В.А. Лукин (г. Москва). Б.В. Леонов стал автором термина «экстракорпоральное оплодотворение» (ЭКО). В первые годы развития ВРТ в программах ЭКО участвовали пациентки исключительно с трубно-перитонеальным фактором бесплодия. Позже, по мере развития ВРТ и с появлением метода аспирации сперматозоидов человека из эпидидимиса (microsurgical epididymal sperm aspiration) в 1988 г., метода интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) в 1992 г. [2] и метода интрацитоплазматической инъекции морфологически нормального сперматозоида (intracytoplasmic morphologically normal sperm injection, IMSI) в 1999 г. (разработанного проф. Б. Барту и соавт. (Израиль)), ЭКО стало незаменимой технологией в лечении мужского бесплодия. В 2005 г. на очередной конференции Европейской ассоциации специалистов по репродукции человека (European Society of Human Reproduction and Embryology) мужской фактор бесплодия признан абсолютным показателем к ЭКО.

По данным руководства Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), около 15 % сексуально активных пар обращаются за медицинской помощью с жалобами на отсутствие наступления беременности в течение 1 года. При этом около 50 % случаев бесплодия обусловлено мужским фактором [3]. Данные ВОЗ согласуются с результатами статистического анализа случаев бесплодия в супружеских парах, обратившихся за лечением в 2015–2017 гг. в клиники «ЭКО Центр» («АльтраВита», Москва) и «Ваш Доктор» (г. Симферополь), где мужской фактор бесплодия был диагностирован в 40 и 43 % случаев соответственно.

Причины снижения фертильности у мужчин разнообразны: врожденные аномалии мочеполовых органов, варикоцеле, нарушения эрекции и эякуляции, иммунологические факторы, урогенитальные инфекции, обструкция семявыносящих путей, заболевания эндокринной системы (гипо-, гипергонадотропный гипогонадизм), генетические отклонения, новообразования половой сферы, повреждение сперматогенного эпителия, вызванное облучением или химиотерапией, системные заболевания, вредные привычки, попадание в организм токсичных веществ, нередко прием лекарственных препаратов.

Почти в 30 % случаев мужского бесплодия диагностируются его идиопатические формы [3]. Для пациентов с идиопатическими формами бесплодия характерно отсутствие в анамнезе явных факторов риска, отсутствие отклонений от нормы при физикальном осмотре и нормальный гормональный профиль при наличии изменений в спермограмме: олигозооспермии, астенозооспермии или тератозооспермии, а также их сочетаний [4]. Согласно результатам исследований ВОЗ заболеваемость мужским бесплодием в странах Африки варьирует от 4,2 до 6,3 %, а в Центральной и Восточной Азии данный показатель самый низкий на планете — до 3 %. Развитые страны Европы и Северной Америки отличаются высокой заболеваемостью мужским бесплодием [5].

Генетически обусловленное мужское бесплодие относится к наименее распространенным формам. Так, по данным M. D. Johnson, частота выявления хромосомных аномалий у бесплодных мужчин составляет 5,8 % [6], при этом мутации, сцепленные с Y-хромосомой, составили 4,2 % случаев, а отклонения в аутосомных хромосомах — 1,5 %.

Одной из форм генетически обусловленного мужского бесплодия является глобозооспермия, представляющая собой грубые нарушения морфологической структуры сперматозоида. Распространенность данной патологии у мужчин с бесплодием, по данным I. Anton-Lamprecht и соавт., не превышает 0,1 %. Данная форма тератозооспермии наиболее характерна для североафриканской популяции, в которой ее частота у мужчин с бесплодием достигает 1,0 % [5].

Диагноз глобозооспермии ставят на основании данных морфологического исследования сперматозоидов, при котором выявлен дефект головки в виде ее округлой формы, а также отсутствие или выраженный дефект акросомы. Формирующаяся в результате мутации округлая головка не способна к связыванию с блестящей оболочкой (*zona pellucida*) яйцеклетки, а дефект акросомы приводит к отсутствию в сперматозоиде гидролитических ферментов (гидролаз), необходимых для растворения блестящей оболочки и проникновения сперматозоида в ооцит. При глобозооспермии в ряде случаев отсутствуют изменения количественных характеристик



спермограммы, а также подвижности сперматозоидов. Из-за характерного для данной патологии вида сперматозоидов при микроскопии в литературе встречается и другое название — «синдром круглой головки сперматозоида».

В зависимости от количества пораженных сперматозоидов выделяют 2 типа глобозоспермии: 1-й тип — тотальная глобозоспермия, при которой поражается 100 % сперматозоидов, и 2-й тип — частичная глобозоспермия, при которой доля пораженных сперматозоидов в эякуляте варьирует от 40 до 80 % [7].

Вопрос исключительно генетической природы развития глобозоспермии в определенной мере остается открытым, однако исследования последних лет все чаще указывают на связь с хромосомными аномалиями. Так, при анализе хромосомного аппарата сперматозоидов методом флуоресцентной гибридизации (*fluorescence in situ hybridization*) частота анеуплоидии у пациентов с глобозоспермией превысила показатели контрольной группы в 1,8 раза (0,66 % против 0,37 %), преобладающими при этом являлись анеуплоидии 13, 16 и 21-й хромосом. На генетическую природу глобозоспермии указывают случаи семейной глобозоспермии. Предполагаются различные варианты наследования: X-сцепленное, аутосомно-доминантное и аутосомно-рецессивное. На данный момент доказано развитие глобозоспермии в гомозиготном состоянии при делеции в гене *DPY19L2* и миссенс-мутации в гене *PICK*, а также мутациях в гене *SPATA16* [8]. Для всех вышеназванных мутаций характерно развитие у пациентов тотальной глобозоспермии (1-го типа).

*PICK1* представляет собой цитозольный протеин, участвующий в белковом обмене. При миссенс-мутации в гене *PICK* в гомозиготном состоянии не происходит слияния проакросомальных везикул и формируется округлая головка сперматозоида. Данный тип мутации также характеризуется аутосомно-рецессивным типом наследования.

*SPATA16* — протеин, проявляющий свою активность в проакросомальных пузырьках и аппарате Гольджи, который участвует в формировании акросомы и сперматогенезе [9]. Для носителей мутаций в гене *SPATA16* характерно снижение концентрации сперматозоидов в эякуляте.

*DPY19L2* — акросомальный трансмембранный протеин, обеспечивающий фиксацию акросомы к ядру сперматозоида. Делеция в гене *DPY19L2* в гомозиготном состоянии — наиболее часто выявляемая мутация при глобозоспермии. При мутации данного типа концентрация сперматозоидов в эякуляте пациентов нормальная или близкая к нормальной. Мутация в гене *DPY19L2* характеризуется аутосомно-рецессивным типом наследования [10].

До разработки метода ICSI не существовало методов преодоления глобозоспермии вне зависимости

от ее типа. Первые сообщения об эффективном лечении глобозоспермии появились в 1994 г., когда К. Lundin и соавт. сообщили об эффективном оплодотворении методом ICSI и наступлении беременности от мужчины с частичной глобозоспермией (2-го типа) [11]. Однако, несмотря на достигнутый прогресс, эффективность ВРТ у данной категории пациентов остается крайне низкой, положительные результаты применения ВРТ у них получены в единичных случаях.

Исследования последних лет свидетельствуют, что у пациентов с тотальной глобозоспермией (1-го типа) исход лечения с применением ВРТ, возможно, взаимосвязан с типом генетической мутации. Так, ассоциированные с мутацией в гене *SPATA16* глобозоспермии на сегодня являются наиболее неблагоприятными для реализации репродуктивных планов: в научной литературе нет сведений о случаях эффективного использования ВРТ и достижения положительных результатов у данной категории пациентов. Как правило, единственным выходом для таких пациентов становятся программы ВРТ с использованием донорской спермы.

При тотальной глобозоспермии (1-го типа), обусловленной делецией *DPY19L2*, в отличие от *SPATA16*, описаны случаи наступления беременности после ICSI с дополнительной активацией ооцитов  $Ca^{2+}$ -ионофором [11–13].

Представляем случай лечения супружеского бесплодия, вызванного мужским фактором — тяжелой формой тератозоспермии (тотальной глобозоспермией 1-го типа).

#### Клиническое наблюдение

*В 2012 г. в клинику «Ваш Доктор» (г. Симферополь) обратилась супружеская пара с жалобами на отсутствие беременности в течение 2 лет 6 мес регулярной половой жизни без использования контрацепции. Супруги были обследованы в объеме, регламентированном приказом Минздрава России от 30 августа 2012 г. № 107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».*

*Супруга, 28 лет, беременностей не было. Менструации с 14 лет 6 мес, установились сразу, регулярные (через 28 дней), по 4–5 дней, умеренные, безболезненные. На диспансерном учете у смежных специалистов не состояла, операций не было. Наследственный анамнез не отягощен. Результаты объективного осмотра, клинико-лабораторного и инструментального обследований в пределах физиологической нормы. Уровень гормонов крови в 3-й день менструального цикла в пределах нормы: фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) — 6,34 мМЕ/мл, лютеинизирующего гормона (ЛГ) — 8,54 мМЕ/мл, эстрадиола — 176 пмоль/л, пролактин — 442 мМЕ/л, тиреотропного гормона — 2,5 мМЕ/л, свободного тироксина —*

10,6 пмоль/л. Ультразвуковое исследование органов малого таза особенностей не выявило, овариальный резерв достаточный. Инфекции, передающиеся половым путем, не обнаружены. Маточные трубы проходимы. Кариотип – 46,XX. Заключение смежных специалистов: соматически здорова.

Супруг, 34 года, детей не имел. На диспансерном учете у смежных специалистов не состоял, операций не было. Уродного младшего брата есть ребенок. В семье по мужской линии проблем с фертильностью не было. Результаты объективного осмотра и общеклинического клинко-лабораторного и инструментального обследований в пределах физиологической нормы. Заключение смежных специалистов: соматически здоров. Уровень гормонов крови в пределах нормы: ФСГ – 1,78 мМЕ/мл, ЛГ – 2,27 мМЕ/мл, эстрадиола – 85 пмоль/л, тестостерона – 20,06 нмоль/л, тиреотропного гормона – 2,27 мМЕ/мл, пролактина – 243 мМЕ/л, глобулина, связывающего половые гормоны, – 19 нмоль/л; индекс свободного тестостерона – 107,8 %. Кариотип – 46;XY, микроделеции (в локусах AZFa, AZFb, AZFc) в участках Y-хромосомы не обнаружены. Предварительная оценка качества спермы выявила у 100,0 % сперматозоидов головку круглой формы без акросомы, т. е. тотальную глобозоспермию (1-го типа).

На основании полученных данных был поставлен диагноз: женское бесплодие первичное, связанное с мужским фактором (глобозоспермией 1-го типа) (N97.4).

Для выработки дальнейшей тактики обследования и лечения пациенты были направлены в ООО «ЭКО центр» (клиника «АльтраВита», г. Москва).

Анализ качества спермы дал аналогичные результаты: подтверждена тотальная глобозоспермия (1-го типа) (табл. 1). С целью оценки ультраструктуры нативных сперматозоидов 100 из них были исследованы методом NASUM (native assessment of sperm ultramorphology) в специальном микроскопе, увеличивающем изображение в 20 тыс. раз, для визуализации отдельных хромосом, степени конденсации хроматина, митохондрий, акросомального аппарата, целостности мембран сперматозоидов (метод разработан к.б.н. С.А. Яковенко (Россия, ООО «ЭКО центр», клиника «АльтраВита»; название принадлежит проф. Б. Барту (Израиль)) (табл. 2).

Таблица 1. Предварительная оценка качества спермы

Table 1. Preliminary evaluation of sperm quality

Показатели микроскопического исследования эякулята Microscopic characteristics of the ejaculate	Норма [14] Normal values [14]	
	Период воздержания, сут Abstinence time, days	5
Время разжижения, мин Liquefaction time, min	15	<60
Объем эякулята, мл Ejaculate volume, ml	2,7	>1,5

Показатели микроскопического исследования эякулята Microscopic characteristics of the ejaculate	Норма [14] Normal values [14]		
	Вязкость эякулята, см Ejaculate viscosity, cm	2,0	<2,0
Цвет эякулята Ejaculate color	Желтовато-серый Yellowish grey	Серо-молочный Grey-opalescent	
Агглютинация сперматозоидов Sperm agglutination	Нет No	Нет No	
Агрегаты Aggregates	Нет No	Нет No	
Эритроциты Erythrocytes	Нет No	Нет No	
Эпителиальные клетки Epithelial cells	Единичные Solitary	Единичные Solitary	
Лейкоциты, млн/мл Leukocytes, million/ml	0,2	≤1,0	
Незрелые половые клетки Immature germ cells	Единичные Solitary	2–4 на 100 сперматозоидов 2–4 per 100 spermatozoa	
Концентрация сперматозоидов Sperm concentration			
Камера анализа 1, млн/мл Counting chamber 1, million/ml	95	>15	
Камера анализа 2, млн/мл Counting chamber 2, million/ml	93		
Среднее значение, млн/мл Mean value, million/ml	94		
Подвижность сперматозоидов (при 25 °C) Sperm motility (at 25 °C)			
Категории А (с быстрым прямолинейным движением (>20 μm/c)), % Category A (rapid linear (>20 μm/s)), %	20	≥20	≥40
Категории В (с медленным прямолинейным движением (<20 μm/c)), % Category B (slow linear (<20 μm/s)), %	43	≥32	
Категории С (с непрямолинейным движением (<5 μm/c)), % Category C (non-linear (<5 μm/s)), %	3	≤2	
Категории D (неподвижные), % Category D (immotile), %	34	<60	
Морфология сперматозоидов (по Крюгеру) Sperm morphology (per Kruger)			
Нормальные формы, % Normal, %	0	≥4	
Дефекты головки, % Head defects, %	100		
Дефекты шейки или средней части, % Neck and midpiece defects, %	19		–
Дефекты хвоста, % Principle piece defects, %	2		
Цитоплазматические капли, % Excess residual cytoplasm, %	18		



**Таблица 2.** Результаты исследования сперматозоидов методом NASUM (native assessment of sperm ultramorphology)

**Table 2.** Results of sperm evaluation using the NASUM method (native assessment of sperm ultramorphology)

Параметр строения Structure parameter	Частота дефектов строения сперматозоидов, % Defects of sperm structure rate, %
Организация хроматина Chromatin organization	15
Хромоцентр Chromocenter	29
Ядерная мембрана Nuclear membrane	54
Митохондриальная оболочка Mitochondrial membrane	60
Аксонема Axoneme	8
Акросома Acrosome	100
Шейка Neck	30
Мембранные вакуоли Membrane vacuoles	5

В результате исследования сперматозоидов данным методом в 100 % случаев было обнаружено отсутствие акросомы и только в 5 % — мембранных вакуолей. Обращает на себя внимание то, что 85 % из них характеризовались нормальной организацией хроматина, а нормальная организация хромоцентра была выявлена в 71 % наблюдений.

Учитывая полученные результаты, пациентам была предложена программа ВРТ с использованием донорской спермы, от которой супруги отказались. Ввиду отсутствия литературных данных об эффективности программ ЭКО у пациентов с тотальной глобозоспермией

(I-го типа) и с учетом категорического желания пациентов осуществить попытку искусственного оплодотворения проведено пробное оплодотворение донорских криоконсервированных ооцитов спермой мужа методом ICSI — без эффекта (табл. 3). Спермограмма супруга в день оплодотворения: объем эякулята — 1 мл. Концентрация сперматозоидов — 200 млн/мл. Доля сперматозоидов категории А — 12 %, категории В — 28 %. Морфологическое исследование сперматозоидов: 0 % нормальных форм по Крюгеру. Глобозоспермия (I-го типа).

После неудачного оплодотворения пациенты на протяжении 4 лет не проходили лечение. В 2016 г. супружеская пара вновь обратилась в ООО «ЭКО центр» (клиника «АльтраВита», г. Москва) с целью возобновить лечение с применением ВРТ, за исключением программ с использованием донорской спермы. Результаты обследования соответствовали полученным в 2012 г. и представленным выше.

Совместно с пациентами принято решение провести программу IMSI по протоколу с использованием антагонистов гонадотропного релизинг-гормона (ГнРГ). Алгоритм индукции суперовуляции включал применение фоллитропина-α (гонала-Ф) в дозе 150 МЕ/сут с 3-го дня цикла (суммарная доза за курс — 1500 МЕ) и антагонистов ГнРГ цетрореликса (цетротид) в дозе 0,25 мг/сут с 5-го дня цикла, а также введение в качестве триггера хориогонадотропина-α (овитреля) в дозе 250 мкг (6500 МЕ) в 12-й день цикла. Пункцию фолликулов осуществляли на 14-й день цикла. В результате были получены 12 ооцитов, 11 из которых были зрелыми (на стадии метафазы II деления мейоза).

Спермограмма супруга в день оплодотворения: объем эякулята — 2 мл. Концентрация сперматозоидов — 70 млн/мл. Доля сперматозоидов категории А — 15 %, категории В — 21 %. Морфологическое исследование сперматозоидов: 0 % нормальных форм по Крюгеру. Глобозоспермия (I-го типа).

В результате проведенного оплодотворения методом IMSI с дополнительной активацией ооцитов Ca<sup>2+</sup>-ионофором

**Таблица 3.** Результаты пробного оплодотворения методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида

**Table 3.** Results of test fertilization using the intracytoplasmic sperm injection

Ооцит Oocyte	День 0 Day 0	День 1 Day 1	День 2 Day 2	День 3 Day 3	День 4 Day 4	День 5 Day 5	День 6 Day 6
1	МII	0pN	—	—	—	—	—
2	МII	0pN	—	—	—	—	—
3	МII	0pN	—	—	—	—	—
4	МII	0pN	—	—	—	—	—
5	МII	0pN	—	—	—	—	—

**Примечание.** МII — зрелые ооциты (на стадии метафазы II деления мейоза).

Note. MII — mature oocytes (at the metaphase of meiosis II).

**Таблица 4.** Результаты оплодотворения методом интрацитоплазматической инъекции морфологически нормального сперматозоида (intracytoplasmic morphologically normal sperm injection)

**Table 4.** Results of fertilization using the intracytoplasmic morphologically normal sperm injection procedure

Ооцит Oocyte	День 0 Day 0	День 1 Day 1	День 2 Day 2	День 3 Day 3	День 4 Day 4	День 5 Day 5	День 6 Day 6
1	МII	2pN	2b	4b	9b	12b	3BA
2	МII	0pN	—	—	—	—	—
3	МII	0pN	—	—	—	—	—
4	МII	0pN	—	—	—	—	—
5	МII	0pN	—	—	—	—	—
6	МII	0pN	—	—	—	—	—
7	МII	0pN	—	—	—	—	—
8	МII	0pN	—	—	—	—	—
9	МII	0pN	—	—	—	—	—
10	МII	0pN	—	—	—	—	—
11	МII	0pN	—	—	—	—	—
12	GV	—	—	—	—	—	—

**Примечание.** GV – герминальный везикул; МII – зрелые ооциты (на стадии метафазы II деления мейоза).

**Note.** GV – germinal vesicle; MII – mature oocytes (at the metaphase of meiosis II).

был получен на 6-е сутки 1 эмбрион визуального хорошего качества (3BA), который был криоконсервирован. Перенос криоконсервированного эмбриона проведен после размораживания через цикл с использованием заместительной гормональной терапии на 21-й день менструального цикла: эстрадиола валерат (прогинова) в дозе 2 мг 1 раз в день и эстрадиола гемидриат (дивигель) в дозе 1 г 1 раз в день, микронизированный прогестерон (утрожестан) в дозе 600 мг/сут интравагинально по стандартной схеме. Беременность не наступила (табл. 4).

В 2017 г. был начат короткий протокол индукции суперовуляции с антагонистами ГнРГ. Алгоритм индукции суперовуляции включал использование фоллитропина- $\alpha$  (гонала-Ф) в дозе 75 МЕ/сут (суммарная доза – 825 МЕ) со 2-го дня цикла, менотропинов ФСГ и ЛГ (менопура) в дозе 75 МЕ/сут (суммарная доза ФСГ – 825 МЕ, ЛГ – 825 МЕ), антагониста ГнРГ цетрореликса (цетротид) в дозе 0,25 мг/сут с 6-го дня цикла, а также введение в качестве триггера хорионического гонадотропина (Московский эндокринный завод ФГУП, Россия) в дозе 9000 МЕ на 12-й день цикла. Пункцию фолликулов осуществляли на 14-й день цикла. В результате были получены 9 ооцитов, 8 из которых были зрелыми (на стадии метафазы II деления мейоза) (1 ооцит дегенеративный (deg)).

Спермограмма супруга в день оплодотворения: объем эякулята – 2 мл. Концентрация сперматозоидов – 76 млн/мл. Доля сперматозоидов категории А – 9 %, категории В – 24 %. Морфологическое исследование спер-

матозоидов: 0 % нормальных форм по Крюгеру. Глобозоспермия (1-го типа).

Ввиду выраженной патологии морфологической структуры сперматозоидов для обработки эякулята в данном протоколе был выбран метод «всплытия», что позволило избежать центрифугирования в градиенте плотности. После «всплытия» разжиженный эякулят помещали в пробирку, поверх наслаивали культуральную среду HEPES с 5 % содержанием белка в количестве 2 мл, пробирку помещали в термостат с температурой 37 °C на 30 мин. Далее верхнюю часть среды перемещали в чистую пробирку и держали при комнатной температуре до проведения IMSI. Для оплодотворения отбирали сперматозоиды с прямолинейным движением.

После выполнения IMSI проводили активацию оплодотворенных ооцитов  $Ca^{2+}$ -ионофором A23187, для чего выдерживали их в течение 15 мин в  $CO_2$ -инкубаторе в специальной среде, приготовленной на основе бикарбонатной культуральной среды с добавлением  $Ca^{2+}$ -ионофора A23187 в дозе 10 мкмоль/л, после чего ооциты отмывали и культивировали по стандартной технологии.

В результате проведенного оплодотворения на 5-е сутки был получен 1 эмбрион визуального хорошего качества (3BA) и осуществлен его перенос в полость матки. На 6-е сутки получен еще 1 эмбрион качества 4BB, который был криоконсервирован (табл. 5).

На 21-й день после эмбриотрансфера путем трансвагинального ультразвукового исследования была диагностирована

**Таблица 5.** Результаты оплодотворения методом интрацитоплазматической инъекции морфологически нормального сперматозоида (intracytoplasmic morphologically normal sperm injection) с активацией ооцитов  $Ca^{2+}$ -ионофором A23187

**Table 5.** Results of fertilization using the intracytoplasmic morphologically normal sperm injection procedure with  $Ca^{2+}$ -ionophore A23187 oocyte activation

Ооцит Oocyte	День 0 Day 0	День 1 Day 1	День 2 Day 2	День 3 Day 3	День 4 Day 4	День 5 Day 5	День 6 Day 6
1	МII	2pN	2b	4b	6b	cod A	c. mor B (st)
2	МII	2pN	4a	6b	9b	12b	st
3	МII	2pN	3b	5b	7b	c. mor	4CC (st)
4	МII	2pN	3b	6b	14b	cod B	4BB
5	МII	2pN	2b	6b	16a	cod A	3BA
6	МII	2pN	4b	7b	12b	c. mor	1C (st)
7	МII	0pN	—	—	—	—	—
8	МII	0pN	—	—	—	—	—
9	Deg	—	—	—	—	—	—

**Примечание.** Deg – дегенеративный ооцит; МII – зрелые ооциты (на стадии метафазы II деления мейоза).  
**Note.** Deg – degenerative oocyte; MII – mature oocytes (at the metaphase of meiosis II).

клиническая беременность. Наблюдение за течением беременности осуществлялось в женской консультации г. Симферополя. Беременность протекала без особенностей и завершилась срочными естественными родами (мальчик массой 3500 г, ростом 54 см, оценка по Апгар на 1-й минуте – 8 баллов, на 5-й минуте – 9 баллов). На данный момент развитие ребенка соответствует возрасту.

### Заключение

1. Оплодотворение с использованием обработки сперматозоидов методом «всплытия» и проведением IMSI с активацией ооцитов  $Ca^{2+}$ -ионофором A23187 может быть использовано у пациентов с тяжелой формой тератозооспермии – тотальной глобозооспермией (1-го типа) с целью достижения положительного результата программ ВРТ.

2. Для уточнения генетической природы тотальной глобозооспермии (1-го типа) рекомендуется генетическое обследование пациента, а также его родственников-мужчин, не имеющих детей, для выявления мутаций и делеций в генах *SPATA16*, *PICK1* и *DPY19L2*.

3. Ввиду отсутствия полных данных об этиологических факторах развития тотальной глобозооспермии (1-го типа), в том числе генетически детерминированных форм, а также наличия единичных случаев эффективного лечения методами ВРТ данной категории пациентов без использования донорской спермы оценить степень генетического риска у потомства не представляется возможным. Целесообразно проведение преимплантационного генетического тестирования эмбрионов у данной категории пациентов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Петров Г.Н. Оплодотворение яйцеклеток у человека вне организма. Труды Крымского мединститута 1957;17:25–6. [Petrov G.N. Fertilization in humans outside the body. Trudy Krymskogo medinstituta = Proceedings of the Crimean Medical Institute 1957;17:25–6. (In Russ.)].
- Thonneau P., Marchand S., Tallec A. et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988–1989). Hum Reprod 1991;6(6):811–6. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137433.
- WHO Manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. Available at: <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9780521431361/en>.
- Andrology: male reproductive health and dysfunction. Ed. by E. Nieschlag, H.M. Behre, S. Nieschlag. 3<sup>rd</sup> edn. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. Pp. 83–87.
- Мужское бесплодие: возможные причины олигоспермии. Доступно по: <http://medbe.ru/news/urologiya-i-andrologiya/muzhskoe-besplodie-vozmozhnye-prichiny-oligospermii>. [Male infertility: possible causes of oligospermia. Available at: <http://medbe.ru/news/urologiya-i-andrologiya/muzhskoe-besplodie-vozmozhnye-prichiny-oligospermii>. (In Russ.)].
- Johnson M.D. Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. Fertil Steril 1998;70(3):397–411. DOI: 10.1016/s0015-0282(98)00209-x.
- WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile

- male. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 102 p.
8. Anton-Lamprecht I., Kotzur B., Schopf E. Roundheaded human spermatozoa. *Fertil Steril* 1976;27(6):685–93.  
DOI: 10.1016/s0015-0282(16)41900-x.
9. Chansel-Debordeaux I., Dandien S., Béchoua S., Jimenez C. Reproduction outcome in globozoospermic men update and prospects. *Andrology* 2015;3(6):1022–34.
10. Kosciński I., Elinati E., Fossard C. et al. *DPY19L2* deletion as a major cause of globozoospermia. *Am J Hum Genet* 2011;88(3):344–50.  
DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.01.018.
11. Lundin K., Sjögren A., Nilsson L., Hamberger L. Fertilization and pregnancy after intracytoplasmic microinjection of acrosomeless spermatozoa. *Fertil Steril* 1994;62(6):1266–7.  
DOI: 10.1016/0020-7292(96)88705-4.
12. Tejera A., Mollá M., Muriel L. et al. Successful pregnancy and childbirth after intracytoplasmic sperm injection with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient. *Fertil Steril* 2008;90(4):1202.e1–5.  
DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.11.056.
13. Egashira A., Murakami M., Haigo K. et al. A successful pregnancy and live birth after intracytoplasmic sperm injection with globozoospermic sperm and electrical oocyte activation. *Fertil Steril* 2009;92(6):2037.e5–9.  
DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.08.013.
14. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5<sup>th</sup> edn. WHO Press, 2010. 394 p.

#### Вклад авторов

В.В. Литвинов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

А.Н. Сулима: анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

М.А. Харитоновна: получение данных для анализа, анализ полученных данных, проведение эмбриологического этапа исследования;

А.А. Клепуков, И.Ю. Ермилова: проведение эмбриологического этапа исследования, анализ полученных данных;

Ю.Ю. Маклыгина: обзор публикаций по теме статьи, проведение генетических исследований.

#### Authors' contributions

V.V. Litvinov: developing the research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing;

A.N. Sulima: analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing;

M.A. Kharitonova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, carrying out the embryological stage of the study;

A.A. Klepukov, I.Yu. Ermilova: carrying out the embryological stage of the study, analysis of the obtained data;

Yu.Yu. Macliygina: reviewing of publications of the article's theme, genetic screening.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

В.В. Литвинов/V.V. Litvinov: <https://orcid.org/0000-0003-2850-799X>

А.Н. Сулима/A.N. Sulima: <https://orcid.org/0000-0002-2671-6985>.

М.А. Харитоновна/M.A. Kharitonova: <https://orcid.org/0000-0002-9341-3044>

А.А. Клепуков/A.A. Klepukov: <https://orcid.org/0000-0002-7364-9068>

И.Ю. Ермилова/I.Yu. Ermilova: <https://orcid.org/0000-0001-7155-3321>

Ю.Ю. Маклыгина/Yu.Yu. Macliygina: <https://orcid.org/0000-0002-7985-1574>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Информированное согласие.** Пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании и публикацию своих данных.

**Informed consent.** All patients gave written informed consent to participate in the study and for the publication of their data.