

essary information to compare them with the features of combined series of inhabitants from Slobozhanshchyna, Halychyna, Volhynia, Podillia, and Middle Dnipro region.

Aim. To introduce new material into scientific circulation, provide a general cranioscopic characterization of skulls from the 18th – 19th centuries in the Chernihiv-Sivershchyna region, and compare this data using multivariate comparative analysis with samples of European populations.

Object and research methods. The study examined 158 skulls from seven archaeological sites in Chernihiv-Sivershchyna, dating from the 17th – 19th centuries. Six cranioscopic traits were analyzed using methodologies developed by A. Kozintsev and others. Statistical processing was carried out using multivariate analysis at the intergroup level.

Results. The analysis revealed that the Chernihiv-Sivershchyna group fits within South European indices for most traits. A moderate occipital index suggests a weak Mongoloid admixture. Multivariate statistical analysis showed similarities with Cossack series from the Middle Dnipro region and, to a lesser extent, with skulls from Ichkeria. Western connections were also identified through cluster analysis.

Conclusions. The study confirms a predominantly European origin for the Chernihiv-Sivershchyna population, with a slight steppe influence. It reveals both southern and western directions of anthropological connections. The results provide a foundation for further research on the biological and historical relationships of this population with other groups in Eastern Europe and the Caucasus.

Key words: ethnic cranioscopy, morphology, anthropology, Homo sapiens, Chernihiv-Sivershchyna, mammal, Polissia, racial studies, craniology; skull; physical anthropology; developmental biology, racial type, eidonomy, biological factor, miscegenation, Europoid race.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Dolzhenko Yu. V.: <http://orcid.org/0000-0001-9807-2835> ^{ABCDEF}

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Dolzhenko Yuriy Volodymyrovych / Долженко Юрій Володимирович
Nizhyn Mykola Gogol State University / Ніжинський державний університет імені Миколи Гоголя
Ukraine, 16600, Nizhyn, 2 Graftska str. / Адреса: Україна, 16600, м. Ніжин, вул. Графська 2
Tel.: +380679412412 / Тел.: +380679412412
E-mail: yuriy_dolzhenko@ukr.net

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 06.07.2024 / Стаття надійшла 06.07.2024 року
Accepted 15.11.2024 / Стаття прийнята до друку 15.11.2024 року

DOI 10.29254/2077-4214-2024-4-175-201-208

UDC 618.111-008:612.621.31:575.113

Feskov O. M., Zhytkova Ye. S., Bezpechna I. M., Yehunkova O. V.,
Blazhko O. V., Chumakova N. O., Feskova A. O.

RESULTS OF PREIMPLANTATION GENETIC TESTING OF BLASTOCYSTS OBTAINED FROM PATIENTS WITH SEVERE FERTILITY FAILURES

Center for Human Reproduction “Clinic of Professor Feskov O.M.” (Kharkiv, Ukraine)

zhytkova@feskov.com.ua

According to the literature, the male factor is the cause of infertility in almost 60% of cases. Currently, research data on the impact of male fertility disorders on embryo development and the occurrence of chromosomal abnormalities are ambiguous.

The aim of this study was to investigate the dependence of the frequency of formation and the presence of changes in the karyotype of blastocysts when embryos are obtained by in vitro fertilization from men with severe spermatogenesis disorders on such indicators as concentration, motility, and morphology of spermatozoa in the ejaculate.

In total, preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) was performed on 974 blastocysts obtained from patients with spermatogenesis disorders and men with normal fertility. Microscopic analysis of the ejaculate was performed according to the WHO guidelines of 2010. Embryos were obtained using assisted reproductive technologies. Preimplantation genetic screening of embryos at the blastocyst stage was performed using a new-generation sequencing method. Statistical hypotheses were tested at the significance levels of 0.05, 0.025, and 0.01.

The proportion of euploid embryos obtained from patients with severe spermatogenesis disorders is statistically significantly lower than that of blastocysts with a balanced karyotype obtained from men with normal reproductive function ($p < 0.05$). A direct correlation was found between the morphology, concentration and motility of spermatozoa in the ejaculate and the total frequency of blastocyst formation, regardless of the embryo karyotype ($t = 6.555$, $t = 8.449$ and $t = 3.354$, respectively). The results obtained in this study indicate that the detection of significant abnor-

malities of spermogram parameters in the microscopic analysis of the ejaculate is an indication for preimplantation genetic screening for aneuploidy in embryos obtained from patients with spermatogenesis disorders.

Key words: spermatogenesis failures, PGT-A, IVF, blastocyst formation rates.

Connection of the publication with planned research works.

The work was performed within the framework of the research project “Determination of the role of pre-treatment to improve the efficiency of cryopreservation and hypothermic storage of cellular structures of different levels of organization” (state registration number 0121U113329).

Introduction.

According to international demographic statistics, about 48.0 million families in 190 countries are infertile [1]. In Ukraine, about 18% of married couples have problems with conception. Treatment of infertility in women and men requires the use of assisted reproductive technologies (ART) [2].

According to the World Health Organization (WHO), a marriage is considered infertile if the wife does not become pregnant during regular sexual intercourse without the use of any contraceptives for one year, provided that the couple is of childbearing age. It is known that both male and female factors can be the cause of an infertile marriage with almost equal frequency, and a significant number of couples have a combination of these factors [3].

According to the literature, in almost 60% of cases, the cause of marital infertility is the male factor [4]. The achievements of modern medicine, in particular the use of ART methods using the procedure of intracytoplasmic sperm injection into an oocyte (ICSI), make it possible to obtain fertilization even from patients with severe spermatogenesis disorders [5]. Currently, research data on the impact of male reproductive dysfunction on embryo development and the occurrence of aneuploidy are ambiguous. For example, in his study, Gat I. (2017) showed no connection between a marked decrease in male fertility and the occurrence of karyotype changes in blastocysts [6]. On the other hand, Ganza A.L. and colleagues (2016) proved in their work that a significant decrease in the concentration of spermatozoa in the ejaculate affects the presence of chromosomal abnormalities in embryos and leads to a reduction in the effectiveness of infertility treatment when using ART [7]. In turn, Tarozzi N. and colleagues (2019) showed in their study a correlation between a decrease in male fertility and the formation of blastocysts with a mosaic karyotype [8].

The aim of the study.

To investigate the dependence of the frequency of formation and the presence of changes in the karyotype of blastocysts when obtaining embryos by *in vitro* fertilization from men with severe spermatogenesis disorders on such indicators as concentration, motility and morphology of spermatozoa in the ejaculate.

Object and research methods.

Primary data and laboratory tests were collected at the Clinic of Professor Feskov O.M. (Kharkiv). This study was approved by the Ethics Committee of Sana-Med LLC (Center for Human Reproduction “Clinic of Professor Feskov O.M.”) following Protocol No. 8 of December 01, 2019. Each patient has signed an Informed Consent form for the use and processing of data. From 2020 to 2024, three groups of patients were considered for whom the results of preimplantation genetic testing for aneuploidy

(PGT-A) of embryos obtained under *in vitro* fertilization (IVF) programs were studied. In Group 1, embryos were obtained from 121 patients with significant spermatogenesis disorders, aged 32 to 43 years, using donor oocytes for fertilization. Group 2 was formed of 82 men with decreased spermogram parameters, aged 35 to 46 years; fertilization was performed using only spousal gametes, with the exclusion of the female factor of infertility in couples. Group 3 was considered as a control group: embryos were obtained using donor gametes. A total of 974 blastocysts were subjected to preimplantation genetic testing: 472, 358, 144 embryos in Groups 1, 2, and 3, respectively. Microscopic analysis of the ejaculate was performed with the interpretation of reproductive function indicators according to the WHO recommendations of 2010 [9].

A molecular genetic analysis of microdeletions of the AZF locus of the Y chromosome: sY84 (DYS273), sY86 (DYS148), sY127, sY134 (DYS224), sY254 (DAZ), sY255 (DAZ) and the SRY gene as an internal control by PCR for men with decreased fertility was performed [10]. DNA was extracted from peripheral blood samples using NucleoSpin Blood DNA extraction kits (Germany). PCR was performed using the ABI PRISM 7500 real-time PCR system (USA). The sequence of primers used followed the recommendations of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

The karyotype of patients with severe spermatogenesis disorders was checked. The cytogenetic method of differential GTG chromosome staining was used to analyze the chromosomes of cultured peripheral blood lymphocytes [11]. The results of the cytogenetic study are presented by the International Human Cytogenetics Nomenclature System [12].

In the framework of *in vitro* fertilization programs, an anti-GnRH protocol was used for controlled ovarian stimulation (COS) of oocyte donors and patients in couples. Oocytes obtained after transvaginal puncture were fertilized by ICSI. The embryos were cultured to the blastocyst stage in GAIN medium Single-step (Austria) at a temperature of 36.9°C-37.1°C and a CO₂ content of 5.5%-5.7% [13]. Preimplantation genetic screening of embryos at the blastocyst stage was performed using the next-generation sequencing (NGS) method [14].

In the statistical analysis, the data were checked for compliance with the law of normal distribution. The Student’s coefficient was used to determine the relationship between the parameters of the microscopic analysis of the ejaculate, the level of aneuploidy in blastocysts, and the morphological features of embryos. The statistical hypotheses were tested using the χ^2 criterion at the significance levels of 0.05, 0.025, 0.01 [15]. Database creation and calculations were performed using the Apache Open Office 4.0.0 software package (Sana-Light LLC, Sana-Med LLC).

Research results and their discussion.

As a result of molecular genetic testing in men with reduced spermogram parameters, no microdeletions of the AZF locus of the Y chromosome sY84 (DYS273), sY86 (DYS148), sY127, sY134 (DYS224), sY254 (DAZ), sY255 (DAZ) were detected. All patients in Group 1 and Group 2 had a normal male karyotype of 46,XY.

Of the 974 blastocysts obtained in the three groups, biopsies were performed on the fifth day of cultivation for 623 embryos and on the sixth day for 351 blastocysts, respectively. A photo of a blastocyst before the biopsy procedure is shown in the figure.

According to the results of PGT-A, it was found that the proportion of euploid embryos obtained from patients in Group 1 and Group 2 with severe spermatogenesis disorders was statistically significantly lower compared to the control group (table 1). There was no statistically significant difference in the frequency of formation of blastocysts with a mosaic karyotype obtained from men with reduced spermogram parameters and in the control group.

When studying the relationship between the presence of aneuploidy in blastocysts obtained from patients with spermatogenesis disorders and classical spermogram parameters, no influence of such indicators of male reproductive function as sperm motility, concentration and morphology on the proportion of aneuploid blastocysts in the study groups was found. However, it has been proven that the total blastocyst formation rate (BFR) for embryos obtained from men with decreased fertility depends on spermatozoa morphology, motility, and concentration in the ejaculate (table 2).

The results obtained in this study indicate that the detection of significant deviations in spermogram parameters during the microscopic analysis of the ejaculate is an indication for preimplantation genetic screening for aneuploidy in embryos obtained from patients with spermatogenesis disorders. This conclusion is of great practical importance, considering the data presented earlier in the literature on the lack of correlation between PGT-A results and sperm quality. For example, Sils E. Scott et al. (2014) demonstrated no correlation between the results of preimplantation genetic diagnostics performed on embryos obtained from oocyte donors and sperm counts [16]. In his study, V. Burruel (2014) showed no difference between the morphological features of blastocysts with a balanced karyotype and the morphology of blastocysts with chromosomal abnormalities on the fifth and sixth days of embryo development [17]. The data presented in this study confirm the connection between the decline in male reproductive function and the quality of embryos obtained in IVF programs, which is of great practical importance, given that a number of authors argue that the quality of embryos depends only on the quality of oocytes [18-21].

Conclusions.

The relationship between male fertility parameters and the quality of embryos obtained in vitro fertilization programs has been proven. It has been shown that a decrease in such parameters of the spermogram as morphology, motility and spermatozoa concentration in the ejaculate leads to a reduction in the overall frequency of blastocyst formation for embryos obtained from men with decreased fertility. It has been established that the



Figure – Blastocyst 5AA according to the classification of D. K.Gardner *in vitro* before the biopsy procedure. Magnification: x250.

Table 1 – Results of preimplantation genetic testing for aneuploidy of blastocysts obtained from patients with spermatogenesis disorders

Groups of patients	Total number of blastocysts, N	Proportion of euploid blastocysts, N (%)	Proportion of aneuploid blastocysts, N (%)	Proportion of blastocysts with mosaic karyotype, N (%)
Group 1	472	281 (59,5) ^{*,***}	118 (25,0)	73 (15,5)
Group 2	358	158 (44,1) ^{*,***}	128 (34,9)	72 (20,1)
Group 3	144	110 (76,4) ^{*,***}	24 (16,7)	10 (6,9)
Statistics	[*] df = 1, $\chi^2_{crit.} = 12,803$, $\chi^2_{act.} = 13,520$, $p < 0,05$ ^{**} df = 1, $\chi^2_{crit.} = 41,646$, $\chi^2_{act.} = 42,932$, $p < 0,05$ ^{***} df = 1, $\chi^2_{crit.} = 18,764$, $\chi^2_{act.} = 19,377$, $p < 0,05$			

Notes: p – significance value, N – number of blastocysts.

Table 2 – Correlation of the presence of aneuploidy in blastocysts obtained from patients with spermatogenesis disorders with classical spermogram parameters

Parameter of the spermogram		Number of men, N	Frequency of blastocyst formation, %	t	p
Name	Mean value, $\bar{X} \pm m_x$				
Mobility, %	33,70±10,15	203	46,60	3,354	$p < 0,05$
Concentration, mil./ml	49,66±17,06	203	46,60	8,449	$p < 0,01$
Morphology, %	10,12±5,93	203	46,60	6,555	$p < 0,01$

Notes: p – significance value, t – Student’s coefficient.

proportion of euploid embryos obtained from patients with severe spermatogenesis disorders is statistically significantly lower compared to the proportion of blastocysts with a balanced karyotype obtained from men with normal reproductive function.

Prospects for further research.

Taking into account that the data from studies on the impact of male reproductive dysfunction on embryo development and the occurrence of aneuploidy are ambiguous, it is promising to conduct a more detailed study of the ejaculate parameters, in addition to microscopic analysis parameters, for a possible link with the formation and ploidy of blastocysts obtained from patients with fertility disorders. At present, it is important to develop methods that will make it possible to select the best embryo as a result of ART treatment for a healthy pregnancy and healthy offspring.

РЕЗУЛЬТАТИ ПРЕІМПЛАНТАЦІЙНОГО ГЕНЕТИЧНОГО ТЕСТУВАННЯ БЛАСТОЦИСТ, ОТРИМАНИХ ВІД ЧОЛОВІКІВ З ВИРАЖЕНИМИ ПОРУШЕННЯМИ ФЕРТИЛЬНОСТІ

Центр Репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.» (м. Харків, Україна)

zhilkova@feskov.com.ua

Згідно літературним даним, чоловічий фактор є причиною безпліддя у подружжі практично у 60% випадків. Наразі дані досліджень щодо впливу порушення фертильності у чоловіків на розвиток ембріонів та виникнення у них хромосомних порушень є неоднозначними.

Метою даної роботи стало дослідження залежності частоти формування і наявності змін у каріотипі бластоцист, при отриманні ембріонів шляхом проведення екстракорпорального запліднення in vitro від чоловіків з вираженими порушеннями сперматогенезу, від таких показників, як концентрація, рухливість та морфологія сперматозоїдів в еякуляті.

Загалом було проведено преімплантаційне генетичне тестування на анеуплоїдії (ПГТ-А) 974 бластоцист, отриманих від пацієнтів з порушенням сперматогенезу та від чоловіків з нормальними показниками фертильності. Мікроскопічний аналіз еякуляту виконано згідно рекомендаціям ВООЗ від 2010 року. Ембріони отримані з використанням допоміжних репродуктивних технологій. Преімплантаційний генетичний скринінг ембріонів на стадії бластоцисти проведено з використанням метода секвенування нового покоління. Статистичні гіпотези перевірені за рівнів значущості 0,05, 0,025, 0,01.

Частка еуплоїдних ембріонів, отриманих від пацієнтів з вираженими порушеннями сперматогенезу, статистично значуще менша у порівнянні з часткою бластоцист зі збалансованим каріотип, отриманих від чоловіків з нормальними показниками репродуктивної функції ($p < 0,05$). Виявлено прямий зв'язок між морфологією, концентрацією та рухливістю сперматозоїдів в еякуляті та загальною частотою формування бластоцист, незалежно від каріотипу ембріона ($t=6,555$, $t=8,449$ і $t=3,354$, відповідно). Отримані у даній роботі результати свідчать про те, що виявлення значних відхилень параметрів спермограми при мікроскопічному аналізі еякуляту є показанням до проведення преімплантаційного генетичного скринінгу на анеуплоїдії ембріонів, отриманих від пацієнтів з порушенням сперматогенезу.

Ключові слова: порушення сперматогенезу, ПГТ-А, ЕКЗ, частота формування бластоцист.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота виконана у рамках НДР «Визначення ролі попередньої обробки для підвищення ефективності кріоконсервування і гіпотермічного зберігання клітинних структур різного рівня організації» (номер державної реєстрації 0121U113329).

Вступ.

За даними міжнародної Демографічної статистики, у 190 країнах світу близько 48,0 млн родин неплідні [1]. В Україні близько 18% подружніх пар мають проблеми із зачаттям. Лікування безпліддя у жінок та чоловіків потребує використання допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) [2].

За визначенням Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) безплідним вважається шлюб, в якому у дружини протягом одного року не виникає вагітності при регулярному статевому житті без застосування будь-яких засобів контрацепції за умови, що подружжя знаходиться в дітородному віці. Відомо, що причиною безплідного шлюбу практично з однаковою частотою можуть бути як чоловічі, так і жіночі фактори, а у значної частини подружніх пар спостерігається поєднання цих чинників [3].

Згідно літературним даним, практично у 60% випадків причиною ненастання вагітності у подружжі є чоловічий фактор [4]. Досягнення сучасної медицини, зокрема застосування методів ДРТ з використанням процедури інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда у ооцит (ІКСІ), дають можливість отримати запліднення навіть від пацієнтів з вираженими пору-

шеннями сперматогенезу [5]. Наразі дані досліджень щодо впливу порушення репродуктивної функції у чоловіків на розвиток ембріонів та виникнення у них анеуплоїдії є неоднозначними. Наприклад, у своєму дослідженні Gat I. (2017) показав відсутність зв'язку між вираженим зниженням показників чоловічої фертильності та виникненням змін у каріотипі у бластоцистах [6]. З іншого боку, Ganza A.L. з колегами (2016) довели у своїй роботі, що значне зниження концентрації сперматозоїдів в еякуляті впливає на наявність хромосомних порушень у ембріонах та веде до зниження результативності лікування непліддя при використанні ДРТ [7]. У свою чергу Tarozzi N. з колегами (2019) показали у своєму дослідженні кореляцію між зниженням показників чоловічої фертильності та формуванням бластоцист з мозаїчним каріотипом [8].

Мета дослідження.

Дослідження залежності частоти формування і наявності змін у каріотипі бластоцист, при отриманні ембріонів шляхом проведення екстракорпорального запліднення in vitro від чоловіків з вираженими порушеннями сперматогенезу, від таких показників, як концентрація, рухливість та морфологія сперматозоїдів в еякуляті.

Об'єкт і методи дослідження.

Збір первинної інформації та лабораторні дослідження проводили в «Клініці професора Феськова О.М.» (м. Харків). Проведення даного дослідження ухвалено Етичним комітетом ТОВ «Сана-Мед» (Центру репродукції людини «Клініка професора Фесько-

ва О.М.») відповідно до протоколу № 8 від 01 грудня 2019 року. Кожним пацієнтом підписана Інформована згода щодо використання та обробки даних. За період 2020-2024 рр. розглянуто три групи пацієнтів, для яких було досліджено результати преімплантаційного генетичного тестування на анеуплоїдії (ПГТ-А) ембріонів, отриманих у рамках програм екстракорпорального запліднення (ЕКЗ). У Групі 1 ембріони отримані від 121 пацієнта зі значними порушеннями сперматогенезу, віком від 32 до 43 років, з використанням донорських ооцитів при заплідненні. Групу 2 було сформовано з 82 чоловіків зі зниженням параметрів спермограми, віком від 35 до 46 років; при цьому було проведено запліднення з використанням виключно гамет подружжя, за умов виключення жіночого фактора безпліддя у парах. Групу 3 було розглянуто, як контрольну групу: ембріони отримані з використанням донорських гамет. Загалом було проведено преімплантаційне генетичне тестування 974 бластоцист: 472, 358, 144 ембріони у Групах 1, 2 та 3, відповідно. Мікроскопічний аналіз еякуляту виконано з інтерпретацією показників репродуктивної функції згідно рекомендаціям ВООЗ від 2010 року [9].

Було проведено молекулярно-генетичний аналіз мікрodelецій AZF-локусу Y хромосоми: sY84 (DYS273), sY86 (DYS148), sY127, sY134 (DYS224), sY254 (DAZ), sY255 (DAZ) і гену SRY як внутрішнього контролю методом ПЛР для чоловіків зі зниженням показників фертильності [10]. Виділення ДНК зі зразків периферичної крові проводилося за допомогою наборів для екстракції ДНК «NucleoSpin Blood» (Німеччина). ПЛР виконано з використанням системи «ABI PRISM 7500 real-time PCR system» (США). Послідовність використаних праймерів відповідає рекомендаціям National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Перевірено каріотип пацієнтів з вираженими порушеннями сперматогенезу. Цитогенетичний метод диференційного забарвлення хромосом GTG застосовувалися для аналізу хромосом культивованих лімфоцитів периферичної крові [11]. Результати цитогенетичного дослідження наведені відповідно до Міжнародної системи номенклатури цитогенетики людини [12].

У рамках програм екстракорпорального запліднення для контрольованої стимуляції овуляції (КСО) донорів ооцитів та пацієнток у подружжях застосовували протокол з ант-ГнРГ. Отримані після трансвагінальної пункції ооцити запліднені методом ІКСІ. Культивування ембріонів до стадії бластоцисти виконано в середовищах GAIN medium Single-step (Австрія) за температури 36,9°C-37,1°C та вмісті CO₂ 5,5%-5,7% [13]. Преімплантаційний генетичний скринінг ембріонів на стадії бластоцисти проведено з використанням метода секвенування нового покоління (next generation sequencing, NGS) [14].

При проведенні статистичного аналізу дані перевірені на відповідність закону нормального розподілу. Для виявлення зв'язку між показниками параметрів мікроскопічного аналізу еякуляту з рівнем анеуплоїдії у бластоцистах та морфологічними особливостями ембріонів використано коефіцієнт Стьюдента. Статистичні гіпотези перевірено за допомогою критерію χ^2 за рівнів значущості 0,05, 0,025, 0,01 [15]. Створення баз даних і проведення розрахунків проводили за

допомогою пакету програм Apache Open Office 4.0.0 (ТОВ «Сана-Лайт», ТОВ «Сана-Мед»).

Результати дослідження та їх обговорення.

У результаті молекулярно-генетичного тестування у чоловіків зі зниженими параметрами спермограми не виявлено мікрodelецій AZF-локусу Y хромосоми sY84 (DYS273), sY86 (DYS148), sY127, sY134 (DYS224), sY254 (DAZ), sY255 (DAZ). У всіх пацієнтів Групи 1 та Групи 2 встановлено нормальний чоловічий каріотип 46,XY.

З 974 бластоцист, отриманих загалом у трьох розглянутих групах, біопсія на п'ятий день культивування була виконана для 623 ембріонів та на шостий день – для 351 бластоцисти, відповідно. Фото бластоцисти перед процедурою біопсії наведено на **рисунку**.

За результатами ПГТ-А встановлено, що частка еуплоїдних ембріонів, отриманих від пацієнтів Групи 1 та Групи 2 з вираженими порушеннями сперматогенезу, статистично значуще менша у порівнянні з даними контрольної групи (**таблиця 1**). Статистично значущої різниці у частоті формуванні бластоцист з мозаїчним каріотипом, отриманих від чоловіків зі зниженими параметрами спермограми, та у контрольній групі не виявлено.

Під час дослідження зв'язку наявності анеуплоїдії у бластоцистах, отриманих від пацієнтів з порушеннями сперматогенезу, з класичними показниками спермограми не виявлено впливу таких показників чоловічої репродуктивної функції, як рухливість, концентрація та морфологія сперматозоїдів, на частку анеуплоїдних бластоцист у досліджуваних групах. Втім доведено, що загальна частота формування бластоцист (ЧФБ) для ембріонів, отриманих від чоловіків зі зниженням фертильності, залежить від морфології, рухливості та концентрації сперматозоїдів в еякуляті (**таблиця 2**).

Отримані у даній роботі результати свідчать про те, що виявлення значних відхилень параметрів спермограми при мікроскопічному аналізі еякуляту є показанням до проведення преімплантаційного генетичного скринінгу на анеуплоїдії ембріонів, отриманих від пацієнтів з порушенням сперматогенезу. Даний висновок має важливе практичне значення, беручи до уваги наведені раніше у літературі дані про відсутність зв'язку результатів ПГТ-А з якістю сперми. Наприклад, Sills E. Scott зі співавт. (2014) у своїй роботі продемонстрували відсутність зв'язку між результата-



Рисунок – Бластоциста 5AA за класифікацією D. K. Gardner *in vitro* перед процедурою біопсії. Збільшення: x250.

Таблиця 1 – Результати преімплантаційного генетичного тестування на анеуплоїдії бластоцист, отриманих від пацієнтів з порушеннями сперматогенезу

Групи пацієнтів	Загальна кількість бластоцист, N	Частка еуплоїдних бластоцист, N (%)	Частка анеуплоїдних бластоцист, N (%)	Частка бластоцист з мозаїчним каріотипом, N (%)
Група 1	472	281 (59,5)*,***	118 (25,0)	73 (15,5)
Група 2	358	158 (44,1)**,***	128 (34,9)	72 (20,1)
Група 3	144	110 (76,4)**	24 (16,7)	10 (6,9)
Статистики	*df = 1, $\chi^2_{crit.} = 12,803$, $\chi^2_{act.} = 13,520$, $p < 0,05$ **df = 1, $\chi^2_{crit.} = 41,646$, $\chi^2_{act.} = 42,932$, $p < 0,05$ ***df = 1, $\chi^2_{crit.} = 18,764$, $\chi^2_{act.} = 19,377$, $p < 0,05$			

Примітки: p – рівень значущості, N – кількість бластоцист.

Таблиця 2 – Зв'язок наявності анеуплоїдії у бластоцистах, отриманих від пацієнтів з порушеннями сперматогенезу, з класичними параметрами спермограми

Параметр спермограми		Кількість чоловіків, N	Частота формування бластоцист, %	t	p
Найменування	Середнє значення, $\bar{X} \pm m_x$				
Рухливість, %	33,70±10,15	203	46,60	3,354	$p < 0,05$
Концентрація, млн./мл	49,66±17,06	203	46,60	8,449	$p < 0,01$
Морфологія, %	10,12±5,93	203	46,60	6,555	$p < 0,01$

Примітки: p – рівень значущості, t – коефіцієнт Стьюдента.

ми преімплантаційної генетичної діагностики проведеної на ембріонах, отриманих від донорів ооцитів, від показників спермограми [16]. V. Vignuel (2014), у своєму дослідженні показав, немає різниці між морфологічними особливостями бластоцист зі збалансованим каріотипом та морфологією бластоцист з хромосомними порушеннями на п'ятий та шостий дні розвитку ембріонів [17]. Наведені у даній роботі дані підтверджують зв'язок між зниженням чоловічої репродуктивної функції й якістю ембріонів, отриманих у рамках програм ЕКЗ, що має важливе практичне значення, беручи до уваги, що ряд авторів стверджує,

що якість ембріонів залежить лише від якості ооцитів [18-21].

Висновки.

Доведено зв'язок між показниками чоловічої фертильності й якістю ембріонів, отриманих у рамках програм екстракорпорального запліднення. Показано, що зниження таких параметрів спермограми, як морфологія, рухливість та концентрація сперматозоїдів в еякуляті веде до зменшення загальної частоти формування бластоцист для ембріонів, отриманих від чоловіків зі зниженням фертильності. Встановлено, що частка еуплоїдних ембріонів, отриманих від пацієнтів з вираженими порушеннями сперматогенезу, статистично значуще менша у порівнянні з часткою бластоцист зі збалансованим каріотипом, отриманих від чоловіків з нормальними показниками репродуктивної функції.

Перспективи подальших досліджень.

Беручи до уваги, що дані досліджень щодо впливу порушення репродуктивної функції у чоловіків на розвиток ембріонів та виникнення у них анеуплоїдії є неоднозначними, перспективним є більш детальне дослідження показників еякуляту, окрім параметрів мікроскопічного аналізу, щодо можливого зв'язку з особливостями формування та плодюстю бластоцист, отриманих від пацієнтів зі порушенням фертильності. Наразі, актуальним є розробка методів, що дадуть можливість обрати найкращий ембріон в результаті лікування непліддя з використанням ДРТ для настання здорової вагітності та отримання здорового потомства.

References / Література

- Ombelet W. WHO fact sheet on infertility gives hope to millions of infertile couples worldwide. Facts Views Vis Obgyn. 2020;12(4):249- 251.
- Hoysda NH, Oktysiuk ZS. Analiz deyakih pokaznikiv reproduktyvnoho zdorovya zhinochogo naseleण्या v Ukraini. Ukr. Med. Chasopis. 2022;5(151):1-3. DOI: [10.32471/umj.1680-3051.151.234026](https://doi.org/10.32471/umj.1680-3051.151.234026). [in Ukrainian].
- Njagi P, Groot W, Arsenijevic J, Dyer S, Mburu G, Kiarie J. Financial costs of assisted reproductive technology for patients in low- and middle-income countries: a systematic review. Human Reproduction Open. 2023;2023(2):hoad007. DOI: <https://doi.org/10.1093/hropen/hoad007>.
- Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. J. Hum. Reprod. Sci. 2015;8(4):191-196.
- Fausser BC, Devroey P, Diedrich K, Balaban B, Bonduelle M, Delemarre-van de Waal HA, et al. Health outcomes of children born after IVF/ ICSI: a review of current expert opinion and literature. Reprod. Biomed. Online. 2014;28(2):162-182. DOI: [10.1016/j.rbmo.2013.10.013](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.10.013).
- Gat I, Tang K, Quach K, Kuznyetsov V, Antes R, Filice M, et al. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with blastocyst aneuploidy or morphological grading. PLoS One. 2017;12(6):e0179002. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179002>.
- Ganza AL, Whitehouse MC, Lee JA, McGovern PG, Bar-Chama N, Copperman AB, et al. Male factor infertility and aneuploidy: do couples with male factor infertility have a lower rate of euploid embryos? Fertility and Sterility. 2016;106(3):226-7.
- Tarozzi N, Nadalini M, Lagalla C, Coticchio G, Zaccà C, Borini A. Male factor infertility impacts the rate of mosaic blastocysts in cycles of preimplantation genetic testing for aneuploidy. Assisted Reproduction Technologies. 2019;36:2047-2055.
- World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. 287 p.
- Pelzman D, Hwang K. Genetic testing for men with infertility: techniques and indications. Translational Andrology and Urology. 2021;10(3):1354-1364. DOI: [10.21037/tau-19-725](https://doi.org/10.21037/tau-19-725).
- Zerova-Lyubimova TE, Gorovenko NG. Standarti analizu preparativ hromosom lyudini (metodichni rekomendaciyi). Kiyiv: Kiyivska medichna akademiya pisyadiplomnoyi osviti imeni P.L. Shupika; 2003. 52 s. [in Ukrainian].
- Shaffer KG, Slovak ML, Campbell LJ. ISCN 2009. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S. Karger; 2009. 138 p.
- Gruber I, Klein M. Embryo culture media for human IVF: which possibilities exist? J Turk Ger Gynecol Assoc. 2011;12(2):110-117. DOI: [10.5152/jtgga.2011.25](https://doi.org/10.5152/jtgga.2011.25).
- Doroftei B, Ilie O, Anton N, Armeanu T, Ilea C. A Mini-Review Regarding the Clinical Outcomes of In Vitro Fertilization (IVF) Following Pre-Implantation Genetic Testing (PGT)-Next Generation Sequencing (NGS) Approach. Diagnostics (Basel). 2022;12(8):1911. DOI: [10.3390/diagnostics.12081911](https://doi.org/10.3390/diagnostics.12081911).

15. Petrie A, Sabin C. Medical Statistics at a Glance. Winnipeg: Blackwell Science; 2000. 157 p.
16. Sills ES. Determining parental origin of embryo aneuploidy: analysis of genetic error observed in 305 embryos derived from anonymous donor oocyte IVF cycles. Mol. Cytogenet. 2014;7:68. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13039-014-0068-5>.
17. Burrue V. Abnormal early cleavage events predict early embryo demise: sperm oxidative stress and early abnormal cleavage. Sci. Rep. 2014;4:6598. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep06598>.
18. Conti M, Franciosi F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. Hum Reprod Update. 2018;24(3):245-266. DOI: [10.1093/humupd/dmx040](https://doi.org/10.1093/humupd/dmx040).
19. Varghese A, Ly K, Corbin C, Mendiol J., Agarwal A. Oocyte developmental competence and embryo development: impact of lifestyle and environmental risk factors. Reproductive BioMedicine Online. 2011;22:410-420. DOI: [10.1016/j.rbmo.2010.11.009](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.11.009).
20. Ozturk S. Selection of competent oocytes by morphological criteria for assisted reproductive technologies. Mol Reprod Dev. 2020;87:1021-1036. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.23420>.
21. Solovova OA, Chernykh VB. Genetics of Oocyte Maturation Defects and Early Embryo Development Arrest. Genes. 2022;13(11):1920. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes13111920>.

РЕЗУЛЬТАТИ ПРЕІМПЛАНТАЦІЙНОГО ГЕНЕТИЧНОГО ТЕСТУВАННЯ БЛАСТОЦИСТ, ОТРИМАНИХ ВІД ЧОЛОВІКІВ З ВИРАЖЕНИМИ ПОРУШЕННЯМИ ФЕРТИЛЬНОСТІ

Феськов О. М., Жилкова Є. С., Безпечна І. М., Єгунькова О. В.,
Блашко О. В., Чумакова Н. О., Феськова А. О.

Резюме. Досліджено зв'язок між процесом формування та плідністю бластоцист, отриманих від чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією методами допоміжних репродуктивних технологій, від таких параметрів, як концентрація, рухливість та морфологія сперматозоїдів в еякуляті. За результатами преімплантаційного генетичного скринінгу на анеуплоїдії встановлено, що частка еуплоїдних ембріонів, отриманих від пацієнтів з вираженими порушеннями сперматогенезу, статистично значуще менша у порівнянні з часткою бластоцист з нормальним каріотипом, отриманих від чоловіків з нормальними показниками репродуктивної функції ($p < 0,05$). Виявлено прямий зв'язок між морфологією, концентрацією та рухливістю сперматозоїдів в еякуляті з загальною частотою формування бластоцист, незалежно від каріотипу ембріона ($t=6,555$, $t=8,449$ і $t=3,354$, відповідно).

З іншого боку, зв'язок наявності анеуплоїдії у бластоцистах, отриманих від пацієнтів з порушеннями сперматогенезу, з класичними показниками спермограми не доведено у досліджуваних групах. Статистично значущої різниці у частоті формуванні бластоцист з мозаїчним каріотипом, отриманих від чоловіків зі зниженими параметрами спермограми та від чоловіків з нормальними показниками фертильності, не виявлено.

Наявність значних відхилень параметрів спермограми при мікроскопічному аналізі еякуляту є показанням до проведення генетичного тестування ембріонів на анеуплоїдії на передімплантаційній етапі. Перспективним є більш детальне дослідження показників еякуляту, окрім параметрів мікроскопічного аналізу, щодо можливого зв'язку з особливостями формування та плідністю бластоцист, отриманих від пацієнтів зі порушеннями фертильності.

Ключові слова: порушення сперматогенезу, ПГТ-А, ЕКЗ, частота формування бластоцист.

RESULTS OF PREIMPLANTATION GENETIC TESTING OF BLASTOCYSTS OBTAINED FROM PATIENTS WITH SEVERE FERTILITY FAILURES

Feskov O. M., Zhylkova Ye. S., Bezpechna I. M., Yehunkova O. V., Blazhko O. V., Chumakova N. O., Feskova A. O.

Abstract. The correlation between such parameters as the concentration, motility and morphology of spermatozoa in the ejaculate with the blastocyst formation rates and ploidy of blastocysts, obtained from men with low reproductive function by assisted reproductive technologies, was investigated. According to the results of preimplantation genetic testing for aneuploidies, it was found out that the part of euploid embryos obtained from patients with severe spermatogenesis failures is statistically lower compared to the quantity of blastocysts with a balanced karyotype obtained from men with normal indices of reproductive function ($p < 0.05$). A direct strong correlation was found between the morphology, concentration and motility of spermatozoa in the ejaculate and the total blastocyst formation rates, regardless of the embryo karyotype ($t=6.555$, $t=8.449$ and $t=3.354$, respectively).

On the other hand, there was no association between the aneuploidies in blastocysts and classical spermogram parameters in patients with spermatogenesis failures in the studied groups. No statistically significant difference was found out in the formation of blastocysts with mosaic karyotype for patients with low spermogram indices and in men with normal fertility.

Detection of significant deviations in spermogram parameters during microscopic analysis of ejaculate is an indication for genetic testing of embryos for aneuploidy at the preimplantation stage. A more detailed study of ejaculate parameters, in addition to microscopic analysis parameters, regarding a possible connection with the features of formation and ploidy of blastocysts obtained from patients with fertility disorders is perspective.

Key words: spermatogenesis failures, PGT-A, IVF, blastocyst formation rates.

ORCID and contribution / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Feskov O. M.: <https://orcid.org/0000-0003-3626-0229>^{EF}

Zhylkova Ye. S.: <https://orcid.org/0000-0002-5706-3577>^{ABCD}

Bezpechna I. M.: <https://orcid.org/0009-0002-9009-8592>^B

Yehunkova O. V.: <https://orcid.org/0000-0003-4996-644X>^B

Blazhko O. V.: <https://orcid.org/0000-0001-5048-7273>^B

Chumakova N. O.: <https://orcid.org/0009-0000-1070-7702>^B

Feskova A. O.: <https://orcid.org/0009-0005-6457-0787>^B

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors confirm that they have no conflict of interest. / Автори підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Zhylkova Yevheniia Stanislavivna / Жилкова Євгенія Станіславівна
Center for Human Reproduction "Clinic of Professor Feskov O.M." / Центр Репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.»
Ukraine, 61098, Kharkiv, 15 Kholodnohirska str. / Адреса: Україна, 61098 м. Харків, вул. Холодногірська 15
Tel.: 0667651055 / Тел.: 0667651055
E-mail: zhilkova@feskov.ua

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 24.07.2024 / Стаття надійшла 24.07.2024 року
Accepted 20.11.2024 / Стаття прийнята до друку 20.11.2024 року

DOI 10.29254/2077-4214-2024-4-175-208-217

UDC 616.61:591.3:546.48:612.6

Shatorna V. F., Krasnov O. O.

THE INFLUENCE OF CADMIUM CHLORIDE ON THE MORPHOGENESIS OF KIDNEYS OF RAT EMBRYOS IN ISOLATED ADMINISTRATION AND ITS COMBINED EFFECT WITH METAL SUCCINATE

Dnipro State Medical University (Dnipro, Ukraine)

verashatornaya67@gmail.com

Environmental degradation has already become a global problem all over the world. The negative impact of ecopollutants on human health increasingly requires comprehensive research not only in medicine, pharmacy, agriculture, but also in morphological and biochemical experimental studies to determine pathological changes in morphogenesis and search for new potential bioantagonists to toxic substances in the environment. Morphological changes of nephrogenesis in rat embryos that were indirectly exposed to cadmium chloride through the mother's body were investigated in the work. The bioantagonistic characteristics of zinc and copper succinates of cadmium nephrotoxicity at their combined intake in an experiment on rats were also determined. The experiment was carried out on pregnant female rats, which received a daily intragastric solution of cadmium chloride alone or in combination with zinc or copper succinate. Morphological changes in the kidneys of rat embryos on the 13th and 19th days of the experiment were studied. The obtained results indisputably prove the nephrotoxicity of cadmium chloride in the indicated dose and method of administration in a chronic experiment on pregnant female rats. It has been proven that the isolated introduction of cadmium chloride provokes a significant expansion of the nephron capsule in the embryos of experimental animals, which occurs due to the formation of edema and a decrease in the area of the vascular body of the nephrons at the end of embryogenesis. In the groups of combined exposure to cadmium with copper or zinc succinates, the parameters of the nephron capsule cavity area were restored to the control data and were significantly lower than the group of isolated exposure to cadmium chloride, which allows us to consider zinc succinate and copper succinate as potential bioantagonists of cadmium chloride when combined in the experiment on rats.

Key words: urinary system, kidneys, nephron, experiment, rats, cadmium, zinc, copper, succinates.

Connection of the publication with planned research works.

The experimental study was carried out as part of the research work of the Department of Medical Biology, Pharmacognosy and Botany of the Dnipro State Medical University "Biological bases of morphogenesis of organs and tissues under the influence of microelements and ultramicroelements in the experiment" (state registration number 0118U006635).

Introduction.

Numerous industrial, household, agricultural, medical and technological projects lead to the spread of heavy metal compounds in the biosystems of the environment, which causes medical concerns about their potential impact on human health and biological sys-

tems [1, 2]. The toxicity of heavy metals depends on several factors, including the dose, route of exposure, and types of chemicals, as well as the age, sex, genetics, and nutritional status of the exposed individuals. Most environmental pollutants are considered systemic toxicants that can cause multiple organ damage even at the lowest levels of exposure [3, 4]. In modern medicine, such pathological conditions of the body are classified as non-infectious diseases.

The kidneys are the main organ that excretes toxins that have entered the body. A large number of nephrons provides a large surface of the endothelial cells of the glomeruli and the epithelium of the renal tubules for contact with them [5, 6, 7]. Physiological role kidney determines their ability support homeostasis organism,