

На правах рукописи

ДОЦЕНКО
Анна Андреевна

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ВОЗРАСТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ
ПРИ БЕСПЛОДИИ**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2021

Работа выполнена в отделе иммунологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (руководитель отдела – д.б.н., проф. Полевщиков А.В.).

Научный руководитель:

доктор биологических наук
профессор

Полевщиков Александр Витальевич

Официальные оппоненты:

Кветной Игорь Моисеевич – доктор медицинских наук, профессор, руководитель Центра молекулярной биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения "Научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Линькова Наталья Сергеевна – доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры терапии, гериатрии и антивозрастной медицины Академии постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта"

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2021 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр. д. 69-71.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 и на сайте <http://iemspb.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2021 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета 24.1.158.01
доктор биологических наук, доцент

Алешина Галина Матвеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Проблема бесплодного брака имеет всемирный характер, во всех развитых странах до 20% семейных пар страдает от отсутствия детей, при этом половина случаев бесплодия приходится на мужское бесплодие (Greenhall, Vessey, 1990). В Российской Федерации проблема является ещё более острой, что осложняет и без того неблагоприятную демографическую ситуацию. На основании обобщения результатов различных скрининговых исследований, от 30 до 50% случаев бесплодия в супружеских парах связаны с мужским фактором, что отражает возрастающее воздействие на организм психоэмоциональных нагрузок, воздействие неблагоприятных экологических, производственных и бытовых факторов (Аполихин и др., 2010; Карпов и др., 2015; Шевырин, 2018).

Единой классификации причин, вызывающих развитие мужского фактора бесплодия, не существует, что также затрудняет изучение механизмов патологии и разработку алгоритмов лечения. Одним из наиболее распространенных подходов к проблеме мужского бесплодия является широкое применение экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Однако и практика ЭКО также имеет ряд сложностей, связанных с несовершенством параметров спермограммы (Lefievre et al., 2007), методическими сложностями в работе с материалом (Gomendio et al., 2007; Md Saidur Rahman et al., 2017), проблемами его криоконсервации (de la Fuente-Lara et al., 2019), оценкой перспектив и целесообразности применения различных вариантов ЭКО (Van Steirteghem et al., 1993; Johnson, 2019).

Проблема мужской инфертильности существо осложняется социальными и демографическими аспектами. По мере роста доли городского населения, удлинения процесса профессиональной подготовке и трудоустройства построение семьи неуклонно переносится на всё более поздний возраст, что неминуемо приводит к необходимости учета возрастного аспекта на всех этапах лечения мужского бесплодия. Между тем, уже после достижения возраста в 25 лет начинаются необратимые возрастные изменения функциональных свойств сперматозоидов, что необходимо учитывать в практике ЭКО (Frattarelli et al., 2008).

При этом следует отметить, что все указанные проблемы лечения мужского бесплодия и практики ЭКО являются следствием полиэтиологичности заболевания, отсутствия единых, патофизиологически обоснованных подходов к трактовке имеющихся данных и предлагаемым схемам лечения (Сухих, Божедомов, 2018).

Степень разработанности темы исследования. Масштабные медико-биологические исследования проблемы мужского бесплодия начались в мире в конце 1930-х гг. С середины 1980-х гг. начался неуклонный рост числа работ по данной тематике в мире, который ещё не достиг пика в настоящее время. Только

в 2019 г. по данным PubMed в мире опубликовано 1854 работы в рецензируемых журналах, посвященных различным аспектам проблемы мужского бесплодия.

Несмотря на широкий фронт работ, многие важнейшие аспекты проблемы остаются нерешенными. До настоящего времени в клинической практике при определении жизнеспособности сперматозоидов используются устаревшие субъективные микроскопические методы учета, основанные на определении целостности мембран при окрашивании сперматозоидов эозин-нигрозином (Björndahl et al., 2003) (или с помощью гипоосмотического набухания (HOS – тест) (Jeyendran et al., 1984). Несомненными недостатками этих методов являются субъективность оценки препарата и достаточная трудоемкость, особенно в случаях низкой концентрации сперматозоидов в нативном образце. При выявлении счетной ошибки необходимо повторять приготовление препарата и его оценку, увеличивая затраты времени на оценку одного нативного образца. Кроме того, влажные препараты не подлежат хранению для проведения контроля качества, а коммерчески доступные растворы эозина являются гипотоническими водными растворами, что негативно влияет на сперматозоиды и приводит к получению ошибочных результатов.

Другая нерешенная проблема связана с неизученностью последовательности внутриклеточных событий в сперматозоиде, ведущих к снижению его жизнеспособности и утрате оплодотворяющей способности (Aitken et al., 1995), а также не решен вопрос о влиянии снижения жизнеспособности сперматозоидов на эффективность экстракорпорального оплодотворения.

Цель исследования. Целью работы является изучение патофизиологических механизмов снижения жизнеспособности сперматозоидов человека и разработка нового метода объективной оценки жизнеспособности сперматозоидов.

Задачи исследования:

1. Разработать новый цитометрический метод оценки жизнеспособности сперматозоидов человека.
2. Изучить механизмы снижения жизнеспособности и оплодотворяющей способности сперматозоидов человека, в том числе в возрастном аспекте.
3. Оценить механизмы снижения жизнеспособности сперматозоидов человека в ходе процесса их криоконсервации.
4. Оценить роль компонентов семенной плазмы в снижении жизнеспособности сперматозоидов у лиц, проходящих лечение по поводу мужского бесплодия.

Научная новизна исследования. Впервые доказано, что изменения углеводного состава поверхностного аппарата сперматозоида являются самым ранним событием, связанным с включением механизма апоптоза в сперматозоидах. С использованием метода проточной цитометрии и витальных

красителей, впервые определена последовательность событий, ведущих к снижению жизнеспособности и утрате оплодотворяющей способности мужских гамет. Доказано, что снижение жизнеспособности сперматозоидов последовательно проявляется в снижении потенциала митохондрии и одновременном изменении состава углеводов гликокаликса, за которыми следуют снижение плотности упаковки хроматина и нарушениях его акросомального комплекса. Впервые показано, что с возрастом происходит ежегодное снижение мембранного потенциала митохондрии сперматозоида на 1%, а в возрастном интервале 26-47 лет ежегодно происходит снижение их оплодотворяющей способности на 2%. Доказано, что в ходе экстракорпорального оплодотворения у лиц, проходящих лечение по поводу мужского бесплодия, низкая вероятность оплодотворения и наступления беременности прямо коррелирует с низким уровнем С3 компонента комплемента в семенной плазме, при этом концентрации IL-1 β , IL-6, IL-8 и антимюллеровского гормона не оказывают влияния на вероятность оплодотворения в ходе этой процедуры.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Главным практическим результатом проведенной работы является разработка нового объективного автоматизированного метода оценки жизнеспособности сперматозоидов человека, основанного на использовании манноза-специфичного меченого лектина луковиц Нарцисса желтого (*Narcissus pseudonarcissus* L.) с использованием проточной цитометрии. Этот результат также имеет важное значение для проведения фундаментальных исследований. Другим практическим результатом работы является подтверждение обоснованности результатов классической спермограммы и их пригодности для построения прогноза успешности экстракорпорального оплодотворения, а также установленная линейная зависимость между концентрацией сперматозоидов в эякуляте и их жизнеспособностью. Важное практическое значение имеет проведенный анализ влияния различных сред для криоконсервации на жизнеспособность спермиев после процедуры замораживания-оттаивания, который показал предпочтительный характер использования модифицированной среды Квина для данной процедуры. Также практическое значение имеют данные о необходимости учета возраста пациентов при выборе сред для консервации сперматозоидов.

Существенное теоретическое значение для патофизиологии имеет получение клинко-экспериментальных данных об отсутствии прямой зависимости между концентрациями провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8, а также антимюллеровского гормона в семенной плазме и способностью сперматозоидов к оплодотворению.

Методология и методы исследования. Методологическая основа работы состояла в последовательном применении методов научного познания. Согласно

поставленным задачам, выбраны современные высокоинформативные физиологические, иммунологические, цитологические и статистические методы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработан новый автоматизированный метод оценки жизнеспособности сперматозоидов человека, основанный на использовании манноза-специфичного лектина из луковиц *Narcissus pseudonarcissus* L., выявляющий самые ранние изменения углеводного состава гликокаликса сперматозоидов в ходе раннего апоптоза.

2. Механизм снижения жизнеспособности сперматозоидов одинаков во всех исследованных возрастных группах мужчин (26-29 лет, 30-34 года и 35-47 лет) и включает этапы снижения потенциала митохондрии сперматозоида и изменения состава углеводов гликокаликса, снижения плотности упаковки хроматина и нарушений его акросомального комплекса.

3. В ходе криоконсервации сперматозоидов происходит общее снижение их жизнеспособности в 2 и более раза вне зависимости от состава консервирующих сред. Механизм снижения жизнеспособности включает описанные выше этапы развития апоптоза. По мере повышения возраста пациентов уровень гибели сперматозоидов при криоконсервации неуклонно возрастает.

4. Среди компонентов семенной плазмы существенное значение для оплодотворяющей функции сперматозоидов имеет уровень СЗ компонента комплемента. Концентрации IL-1 β , IL-6, IL-8, а также антимюллеровского гормона не оказывают достоверного влияния на оплодотворяющую способность сперматозоидов в ходе процедуры экстракорпорального оплодотворения.

Личный вклад в проведение исследования. Автор диссертационного исследования принимала непосредственное участие на всех этапах: организация, планирование, постановка и проведение экспериментов, забор материала, проведение анализа спермограммы по стандартному протоколу, проведение цитометрического анализа, статистическая обработка полученных количественных данных, анализ полученных результатов, подготовка рукописи диссертационного исследования.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных научных результатов основана на использовании современных методов исследования, в том числе объективного автоматизированного метода проточной цитометрии, адекватных поставленным задачам, тщательной математической обработки данных, полученных при анализе значительного объема экспериментального материала. Материалы диссертационной работы были представлены в докладах на: XXVII – XXX Ежегодных международных конференциях Российской Ассоциации Репродуктологов Человека (РАРЧ) «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (соответственно, 6-9 сентября 2017 г., Санкт-Петербург; 5-8 сентября 2018 г., Уфа; 4-7 сентября 2019 г.,

Ростов-на-Дону; 8 - 12 сентября 2020 года, on-line), 34th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (1-4 июля 2018 г., Барселона, Испания), 3rd International EXPERMED Congress (11-14 апреля 2019 г., Фамагуста, Турецкая Республика Северного Кипра), VII и VIII Международных конференциях «Краеугольные аспекты репродуктивной медицины» (соответственно, 6-9 июня 2019 г. и 5-8 декабря 2019 г., Москва), XI Международном конгрессе Казахстанской Ассоциации Репродуктивной Медицины «Современные подходы к лечению бесплодия. ВРТ: настоящее и будущее» (1-3 ноября 2019 г., Алматы, Казахстан).

Публикации по теме работы. По материалам диссертации получен Патент РФ (№ 2689791, от 29.05.2019 г.), опубликовано 6 журнальных статей, все статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для размещения материалов кандидатских диссертаций.

Объем и структура диссертации. Диссертация построена по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов, их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 126 страницах, проиллюстрирована 29 таблицами и 7 рисунками. Список использованной литературы включает 124 источника, из которых 35 работ на русском языке и 89 работ на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Характеристика больных. В работе был использован эякулят 188 пациентов, проходивших лечение по поводу бесплодия в лаборатории клинической эмбриологии отделения вспомогательных репродуктивных технологий СПбГБУЗ «Городская Мариинская больница», г. Санкт-Петербург. От всех пациентов было получено осведомленное согласие.

Пациенты были разделены на 3 возрастные группы: 26-29 лет (43 человека), 30-34 года (87 человек) и 35-47 лет (58 человек). При этом в рамках работы с клетками был использован материал 54 пациентов, в рамках работы с семенной плазмой – 134 человек. В рамках подготовки к проведению экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) все пациенты проходили углубленное микробиологическое и вирусологическое обследование. Для всех пациентов были получены отрицательные результаты на наличие антигенов и нуклеиновых кислот вирусов ВИЧ, гепатита В и С, хламидий, микоплазмы, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis* в крови и семенной плазме. К исследованию и процедуре ЭКО также не привлекались пациенты, позитивные по Грам⁺ и Грам⁻ патогенной кокковой микрофлоре в мазках из уретры. Около 30% включенных в исследование пациентов были носителями уреоплазмы, вирусов простого

герпеса и цитомегаловируса, а у 25% пациентов в мазках из уретры определялась условно-патогенная энтерококковая микрофлора. В ходе обследования по результатам анамнестических данных и результатов лабораторного обследования было проведено разделение пациентов на группы. Условием невключения в исследование было повышенное значение СОЭ, наличие лейкоцитов в эякуляте (в количестве более 1 млн/мл) как косвенного признака воспалительного процесса, а также сниженный объем эякулята (менее 2 мл).

Контрольную группу составили 16 доноров спермы, не имевших отклонений ни по одному из критериев спермограммы, установленных рекомендациями ВОЗ.

Получение материала. Стандартная подготовка перед получением материала включала 10-дневное исключение алкоголя, курения и тепловых процедур (бани, горячие ванны), а также 3-дневное половое воздержание. В исследование не включали пациентов, имевших эпизоды повышения температуры тела выше 37,3°C в предшествующие 30 дней.

Материал собирали в стерильные пластиковые контейнеры и через 30-60 мин после получения для всех образцов эякулята оценивали показатели спермограммы, в том числе объем материала, концентрацию сперматозоидов, долю прогрессивно-подвижных форм (%%), долю клеток с нормальной морфологией (%%) и аномальных круглых клеток (млн/мл), а также и другие стандартные параметры спермограммы, с использованием световой микроскопии согласно рекомендациям ВОЗ (ВОЗ, 2010).

Анализ спермограммы. Анализ спермограммы и морфологии проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ (2010). Объем полученного материала измеряли в градуированной стерильной пробирке по шкале. Для подсчета концентрации и общего числа сперматозоидов использовали счетную камеру Маклера для спермы и микроскоп (Leica, Германия) с бинокулярной насадкой при объективе 40x. Оценку морфологии сперматозоидов проводили методом световой микроскопии при объективе 100x под масляной иммерсией, определяя процент клеток с нормальной морфологией и долю округлых клеток. Долю агглютинировавших клеток оценивали во влажном препарате с использованием микроскопа Leica с бинокулярной насадкой при объективе 40x согласно рекомендациям (ВОЗ, 2010). Процент прогрессивно-подвижных форм типа PR оценивали в счетной камере Маклера для спермы на микроскопе (Leica) с бинокулярной насадкой при объективе 40x.

Получение семенной плазмы. Часть эякулята центрифугировали в течение 20 мин при 200g для отделения сперматозоидов от семенной плазмы. Полученный надосадок замораживали в стерильных криовиалах (Nunc, США) в жидком азоте до проведения исследования.

Криоконсервация сперматозоидов. Для криоконсервации сперматозоидов использовали четыре различных протокола с использованием четырех коммерческих наборов для криоконсервации, которую осуществляли при полном соблюдении рекомендаций производителей. В работе использовали среду Квина, усовершенствованную для заморозки спермы (Sage, США), набор Sperm Freezing Medium (MediCult, Дания), набор Freezing Medium (Irvine Scientific, США) и раствор Spermfreeze Solution (Vitrolife, Швеция).

Лектин. В работе использовали подобранный эмпирически лектин из луковиц нарцисса желтого (*Narcissus pseudonarcissus* L.), специфичный к α DMa, производства НПК "Лектинотест" (Украина). Лектин нарцисса (NPA) был помечен флюоресцеинизотиоцианатом (FITC).

Использование метода проточной цитометрии для оценки жизнеспособности сперматозоидов. Полученный от каждого пациента материал разделяли на 6 аликвот. Нативный эякулят *Рабочей аликвоты* подвергали стандартной обработке в рамках проведения процедуры ЭКО и использовали для экстракорпорального оплодотворения ооцитов. После процедуры ЭКО бластоцисты имплантировали в стенку матки женщины-реципиента, а о наступлении беременности судили по уровню хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в крови женщины на 10 сутки после имплантации. Уровень ХГЧ определяли методом иммуноферментного анализа по методике изготовителя наборов (НПО «Иммунотэкс», Россия). Успехом процедуры ЭКО и достоверным наступлением беременности считали повышение уровня ХГЧ свыше 25 мМЕ/мл на 10 сутки после ЭКО, хотя иногда беременность наступала и при более низких сывороточных концентрациях ХГЧ на указанном сроке.

Материал аликвоты 1 (в дальнейшем среда 1, контроль) также представлял собой нативный эякулят, который не подвергали процедуре замораживания-хранения-оттаивания, разбавляли равным объемом ЗФР и отделяли от семенной плазмы путем центрифугирования при 200 g в течение 8 мин при комнатной температуре. Полученный осадок ресуспендировали в 200 мкл ЗФР и использовали для цитометрического анализа.

Материал аликвот 2-5 (в дальнейшем среды 2-5) замораживали в жидком азоте после добавления равного объема консервирующей среды к нативному эякуляту с использованием коммерческих наборов для криоконсервации, процедуру которой проводили в соответствии с методикой изготовителей. Для аликвоты 2 использовали набор Sperm Freezing Medium, для аликвоты 3 – среду Квина, для аликвоты 4 – набор Freezing Medium, для аликвоты 5 – раствор Spermfreeze Solution. Замороженные порции эякулята хранили в жидком азоте от 1 до 30 сут, а после размораживания при комнатной температуре разбавляли равным объемом ЗФР и готовили для цитометрического анализа аналогично среде 1.

В ходе пробоподготовки для проточной цитометрии для всех образцов, находившихся в средах 1-5, параллельно использовали четыре метода оценки жизнеспособности сперматозоидов: краситель DiOC₆(3) для оценки мембранного потенциала митохондрий; краситель SYTO16 green для оценки целостности мембраны и плотности упаковки его ядерного хроматина; краситель Родамин-123 для оценки состояния акросомального аппарата и митохондрий; а также меченный FITC лектин нарцисса (NPA).

Для всех красителей в ходе цитометрического исследования анализировали не менее 50000 одиночных клеток. С целью разделения одиночных клеток и их агрегатов использовали сочетания сигналов по прямому (FS, величина, пропорциональная размеру клеток) и боковому (SS, величина, характеризующая структуру клеток) светорассеянию – интенсивность пикового против интенсивности интегрального сигналов по FS или SS, а также время полета против интенсивности интегрального сигналов FS или SS. Результат выражали в виде процента позитивных по окраске клеток. Анализ полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения Kaluza™ (Beckman Coulter, США).

Оценка уровней ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, С3 компонента комплемента и антимюллеровского гормона в семенной плазме методом иммуноферментного анализа. Часть эякулята центрифугировали в течение 20 мин при 200g для отделения сперматозоидов от семенной плазмы. Полученный надосажок замораживали в стерильных криовиалах (Nunc, США) в жидком азоте до тестирования на уровни цитокинов. Все пациенты были разделены на две группы по результатам ЭКО (процент оплодотворенных ооцитов): Группа 1: Пациенты с нормальным и высоким процентом оплодотворения (более 50%), всего 77 пациентов; Группа 2: Пациенты с низким процентом или отсутствием оплодотворения (менее 50%), всего 57 пациентов. Уровни ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, С3 компонента комплемента и антимюллеровского гормона в семенной плазме оценивали методом иммуноферментного анализа по инструкции производителя с помощью наборов ООО "Цитокин" (Санкт-Петербург). Для всех факторов результата выражали в пг/мл, для С3 компонента комплемента – в нг/мл.

Методы статистического анализа. Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа в соответствии с результатами проверки сравниваемых совокупностей на нормальность распределения (Плавинский, С.Л., 2005; Зайцев В.М. и др., 2006; Glantz, S.A., 2011; Petri, Sabin, 2013). Накопление, корректировку, систематизацию исходной информации и визуализацию полученных результатов осуществляли в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2010. Статистический анализ проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics 20 (Наследов, 2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Параметры спермограммы у пациентов разных возрастных групп. Все пациенты были разделены на 3 возрастные группы: 26-29 лет, 30-34 года и 35-47 лет. Основные полученные результаты приведены в табл.1.

Таблица 1.

Основные показатели спермограммы и усредненные результаты ЭКО пациентов разных возрастных групп, проходивших лечение по поводу бесплодия, $M \pm m$

| Показатель и единицы его измерения | Референсные значения | Возрастные группы | | |
|---|----------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | 26 – 29 лет (n = 12) | 30 – 34 года (n = 25) | 35 – 47 лет (n = 17) |
| Объем материала, мл | более 1,5 | 3,3 ± 0,2 | 3,5 ± 0,5 | 3,7 ± 0,5 |
| Концентрация клеток, млн/мл | более 15 | 62,7±14,1 | 59,0±11,5 | 45,8±11,9 |
| Прогрессивно-подвижные клетки, тип PR, %% | более 32 | 44,8 ± 7,7 | 45,2 ± 6,6 | 43,8 ± 8,2 |
| Клетки с нормальной морфологией, %% | более 4 | 6,9 ± 1,9 | 5,6 ± 1,5 | 7,4 ± 1,7 |
| Округлые клетки, млн/мл | менее 5 | 6,1 ± 0,4* | 8,1 ± 0,2 | 8,3 ± 0,4* |
| Наличие лейкоцитов в эякуляте, % | менее 1 | 7 | 9 | 20 |
| Наличие агглютинировавшихся клеток, % | 0 | 7 | 0 | 0 |
| Наличие IgG на сперматозоидах, % | 0 | 3,3 | 2,6 | 5,0 |
| Наличие IgA на сперматозоидах, % | 0 | 4,5 | 3,9 | 4,0 |
| Стандартная процедура ЭКО, % | – | 50 | 48 | 12 |
| ЭКО в модификации ICSI, % | – | 50 | 52 | 88 |
| Наступление оплодотворения, % | – | 88 | 79 | 61 |
| Доля TQ-эмбрионов высокого качества через 72 ч после ЭКО, % | – | 60 | 44 | 44 |

Примечание: * - различия между помеченными знаком средними достоверны согласно *t*-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Приведенные в табл. 1 результаты указывают, что у большинства пациентов всех возрастных групп показатели спермограммы находятся в пределах референсных значений, установленных в Рекомендация ВОЗ в 2010 г. Тем не менее, если объем эякулята во всех случаях соответствовал нормальным значениям, то концентрация спермиев менее 15 млн/мл отмечалась в 14,9% случаев пациентов старше 35 лет, доля прогрессивно-подвижных спермиев

менее 32% отмечалась у 21,3% пациентов. Более того, морфология клеток оказалась весьма чувствительным и информативным показателем: у лиц, проходивших лечение по поводу бесплодия: порога в 4% клеток с нормальной морфологией не достигли 36,2% из общего числа исследуемых, а повышенное содержание округлых клеток (более 5 млн/мл) отмечалось в 7,3% случаев преимущественно в группах 30-34 года и старше 35 лет. Также в 2,4% случаев по результатам спермограммы исследуемых отмечалась агглютинация сперматозоидов, выявленная в группе 26-29 лет. Более того, согласно полученным результатам, полное соответствие спермограммы принятым нормам по всем показателям наблюдалось всего в 41,0% случаев. У 35,9% исследуемых один из показателей имел значение, отклоняющееся от референсных, у 15,4% исследуемых таких показателей было 2. В 7,7% случаев от нормы отличались 3 и более показателей спермограммы.

Результаты также позволили оценить значение показателей спермограммы для прогнозирования результатов ЭКО: согласно данным статистического анализа, два показателя (концентрация сперматозоидов в эякуляте и процент клеток с нормальной морфологией) достоверно влияли на эффективность ЭКО, что согласуется с литературными данными. Результаты работы подтверждают, что даже традиционные наиболее распространенный вариант спермограммы позволяет получить крайне важную достоверную информацию, которая может быть использована при прогнозировании результатов лечения мужской infertility с использованием ЭКО. Это результат подтверждает надежность и валидность показателей классической спермограммы.

Полученные результаты хорошо согласуются с представлениями о роли воспаления и повреждении сперматозоидов активными формами кислорода, но лишь частично подтверждают гипотезу о главенствующей роли аутоиммунных реакций в развитии мужского бесплодия. Наличие иммуноглобулинов классов IgG и IgA на поверхности сперматозоидов установлено лишь в 3,3-5,0 и 3,9-4,0 %% случаев, соответственно, при этом не наблюдается статистической зависимости между уровнем агглютинации спермиев и обнаружением на их поверхностях антител классов IgG или IgA.

Оценка жизнеспособности сперматозоидов человека методом проточной цитометрии. Проведенные исследования обеспечили получение новых результатов, касающихся патогенетических механизмов мужского бесплодия и их прогностической значимости в ходе ЭКО. Результаты применения 4 различных красителей для оценки жизнеспособности сперматозоидов приведены на рис. 1.

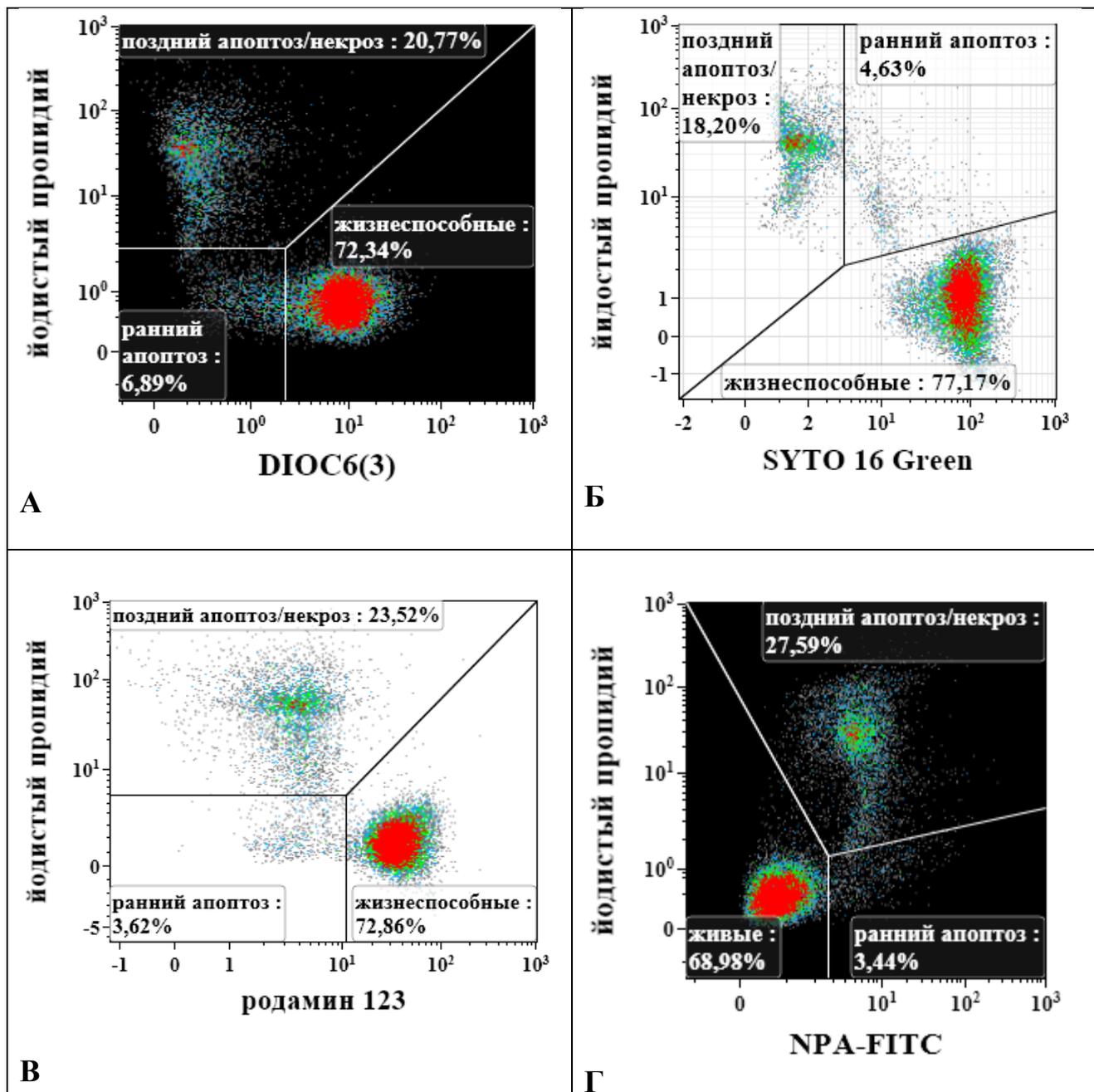


Рис.1. Результаты оценки жизнеспособности сперматозоидов методом проточной цитометрии по одной пробе при использовании различных красителей и йодистого пропидия (PI).

А – DIOC6(3), Б – SYTO16 green, В – Родамин123, Г – NPA-FITC. По оси абсцисс: интенсивность свечения основного красителя, усл. ед.; по оси ординат: интенсивность свечения йодистого пропидия, усл. ед. Другие обозначения в поле рисунка.

Окрашивание DiOC6(3), проникновение которого в клетку прямо связано с показателем митохондриального потенциала, позволяет отнести 72,34% клеток к живым за счет интенсивного проникновения красителя в клетки (рис.1А). По мере развития апоптоза происходит снижение потенциала митохондрий. В условиях падения митохондриального потенциала, но до утраты полупроницаемости плазмалеммы и проникновения йодистого пропидия в

клетку (что соответствует стадии раннего апоптоза) находится 6,89% клеток. Повышение проницаемости плазмалеммы для PI, ассоциированное с низким митохондриальным потенциалом, указывает на стадию позднего апоптоза, в котором по результатам цитометрического анализа находятся 20,77% сперматозоидов. Зонд SYTO16 green позволяет оценить состояние 77,17% сперматозоидов как живых, 4,63% клеток – как клеток в раннем апоптозе и 18,20% - как клеток в позднем апоптозе (рис. 1Б).

Аналогично окрашивание Rh123 и PI клеток той же пробы подтвердило полную жизнеспособность 72,86% клеток, позволило оценить долю клеток в раннем апоптозе равной 3,62%, а клеток в позднем апоптозе – равной 23,52% (рис.1В). На рис. 1Г приведены результаты оценки сперматозоидов из одной и той же пробы с использованием окрашивания NPA-FITC и PI. Лигандом NPA является α -D-манноза, которая характерна для нижних структур гликокаликса всех клеток млекопитающих.

Терминальные по маннозе группировки открываются по мере развития апоптоза. Поэтому живые клетки минимально окрашиваются как NPA, так и PI. Доля живых клеток при окрашивании лектином составляет 68,98%. Развитие апоптоза связано с утратой верхних слоев гликокаликса, что предшествует повышению проницаемости плазмалеммы для PI, поэтому клетки в раннем апоптозе, доля которых составляет 3,44%, интенсивнее окрашиваются NPA при слабом окрашивании PI.

Усиление окрашивания PI указывает на переход к позднему апоптозу, долю клеток в котором при данном окрашивании можно оценить в 27,59%. Проведенная в ходе работы оценка возможности применения манноза-специфичного лектина нарцисса NPA позволила создать новый способ оценки жизнеспособности сперматозоидов, основанный на изменениях состава и структуры гликокаликса сперматозоидов с использованием метода проточной цитометрии (патент Российской Федерации № 2689791, 2019 г.).

Результаты использования четырех красителей позволили получить новые сведения о молекулярных и клеточных механизмах дисфункции сперматозоидов, ведущих к снижению их оплодотворяющей способности. Они указывают, что изменение состава углеводов гликокаликса и сопутствующее снижение заряда плазмалеммы сперматозоида всегда предшествуют другим изменениям гамет и являются самым жестким критерием их жизнеспособности. В силу отсутствия ранее метода оценки состава гликокаликса сперматозоидов данный результат получен впервые и аналогичные данные в литературе отсутствуют.

Полученные в работе результаты по упаковке ядерного хроматина, состоянию акросомы спермия и его энергетического аппарата полностью соответствуют литературным данным и позволяют выдвинуть новую гипотезу о последовательности альтерации сперматозоидов, ведущей к развитию мужской

инфертильности. Первым событием, свидетельствующим о снижении оплодотворяющей способности спермиев, является изменение состава их гликокаликса, сопряженное с изменением заряда мембраны и состоянием распознающего аппарата спермия. Эти изменения выявляются лектином NPA. Вторым событием по времени проявления, но не по времени начала процесса, запускающим каскад структурных и функциональных изменений сперматозоида, является разрушение структуры хроматина, что выявляется при окрашивании Родамином-123. Практически одновременно с разрушением хроматина проявляется снижение мембранного потенциала митохондрии спермия, что ведет к выраженному уменьшению его подвижности и оплодотворяющей способности и выявляется при окрашивании красителем DiOC6(3). Наконец, разрушение структуры хроматина и снижением уровня продукции АТФ в митохондрии сопровождается снижением внутриклеточного транспорта и угнетением функции акросомы, которая является специализированной лизосомой, сформированной в аппарате Гольджи. Это изменение, выявляемое при окрашивании красителем SYTO16 green, резко ослабляет способность спермия к пенетрации, что равносильно утрате его способности к оплодотворению. Из указанных факторов самым обратимым и меняющимся в широких пределах на стадии раннего апоптоза являются митохондриальный потенциал. Остальные показатели варьируют в очень узких пределах, что косвенно указывает на необратимость связанных с ними изменений.

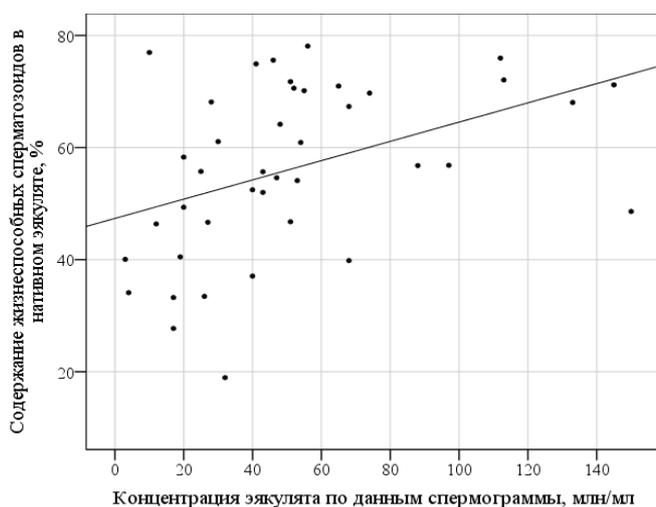


Рис. 2. Зависимость содержания жизнеспособных сперматозоидов в нативном эякуляте (%) от концентрации сперматозоидов (млн/мл).

Обозначения осей приведены в поле рисунка.

Прямая на графике выражает следующую зависимость:

$$Y_{СЖС} = 47,36 + 0,17X_{КС}, \text{ где}$$

где $Y_{СЖС}$ – содержание жизнеспособных сперматозоидов в нативном эякуляте (%), $X_{КС}$ – концентрация сперматозоидов по данным спермограммы (млн/мл).

Проведенный статистический анализ позволил связать между собой значимость показателей концентрации сперматозоидов в эякуляте и их жизнеспособности, выразить её линейной зависимостью, выведенной с помощью метода парной линейной регрессии, графическое изображение которой представлено на рис. 2. Исходя из значения коэффициента регрессии,

увеличение концентрации сперматозоидов на 1 млн/мл позволяет предположить рост содержания жизнеспособных сперматозоидов в нативном эякуляте на 0,17%.

Таблица 2

Результаты оценки жизнеспособности нативных и криоконсервированных сперматозоидов по результатам цитометрического исследования, % жизнеспособных сперматозоидов от общего числа клеток, $M \pm m$, $n \geq 50$ по каждой точке

| Краситель Среда | DiOC ₆ (3) | SYTO16 | Rh123 | NPA | $\frac{W'}{p_{W'}}$ |
|--------------------|-----------------------|------------|------------|------------|-------------------------|
| контроль | 53,6 ± 2,1 | 54,4 ± 2,3 | 53,1 ± 2,4 | 51,5 ± 2,7 | $\frac{0,234}{< 0,001}$ |
| 2 | 22,5 ± 1,6 | 20,8 ± 1,7 | 19,9 ± 1,7 | 19,6 ± 1,7 | $\frac{0,086}{< 0,01}$ |
| 3 | 24,9 ± 1,7 | 24,5 ± 1,9 | 24,2 ± 1,9 | 23,4 ± 1,9 | $\frac{0,072}{< 0,01}$ |
| 4 | 15,0 ± 1,6 | 12,2 ± 1,4 | 11,6 ± 1,4 | 12,2 ± 1,4 | $\frac{0,103}{< 0,001}$ |
| 5 | 23,5 ± 1,6 | 21,9 ± 1,6 | 21,0 ± 1,7 | 21,4 ± 1,6 | $\frac{0,075}{< 0,01}$ |
| W | 0,722 | 0,755 | 0,752 | 0,790 | - |
| p_W | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | - |

Примечание: Значения коэффициента конкордантности Кендалла: W – для красителя (столбец таблицы), p_W – его достоверность; W' – для среды (строка таблицы), $p_{W'}$ – его достоверность.

Как указано выше, один и тот же образец эякулята разделяли на 5 параллелей, параметры первой из которых оценивали без криоконсервации и считали контрольными. Четыре остальные параллели подвергали криоконсервации с использованием различных сред: Sperm Freezing Medium (в дальнейшем – среда 2), для аликвоты 3 – среду Квина, усовершенствованную для заморозки спермы (в дальнейшем – среда 3), для аликвоты 4 – набор Freezing Medium (в дальнейшем – среда 4), для аликвоты 5 – раствор Spermfreeze Solution (в дальнейшем – среда 5). Результаты оценки жизнеспособности сперматозоидов после криоконсервации с использованием указанных сред приведены в табл. 2, из данных которой видно, что что лишь половина сперматозоидов в эякуляте пациентов с мужским бесплодием может рассматриваться как полноценные живые клетки даже в случае нативного материала (контроль, среда 1), остальные клетки имеют признаки апоптоза. На этот результат указывают все использованные красители, что подтверждает его надежность. Снижение жизнеспособности затрагивает энергетический аппарат клетки (краситель DiOC₆(3), снижение жизнеспособности на 46,4%), плотность

упаковки хроматина в ядре (краситель SYTO16, снижение на 45,6%), акросомальный комплекс (краситель Rh123, снижение на 46,9%) и состояние поверхностного аппарата сперматозоида, включая его распознающий аппарат (краситель NPA, снижение жизнеспособности на 48,5%). Сходная величина снижения жизнеспособности гамет подтверждается высокой однородностью значений, что отражает достоверность показателя W' , равного 0,234 ($p < 0,001$). Данные таблицы 2 также свидетельствуют, что любая схема консервации сперматозоидов вызывает дальнейшее снижение их жизнеспособности после размораживания в 2 – 4 раза. В 2 раза жизнеспособность сперматозоидов снижается при использовании среды 3, практически в 4 раза – при использовании для криоконсервации среды 4. Использование сред 2 и 5 приводит к промежуточным показателям снижения жизнеспособности мужских гамет относительно сред 3 и 4. Согласно показателю конкордантности Кендалла W' эти результаты также носят высоко достоверный характер для каждой из криоконсервирующих сред ($p < 0,01$ и менее).

Таблица 3

Сопоставление уровней жизнеспособности нативных сперматозоидов (по результатам использования различных красителей) с наступлением беременности после процедуры ЭКО, $M \pm m$

| Уровень ХГЧ в сыворотке женщины | менее 25 мМЕ/мл | | 25 мМЕ/мл и более | | p |
|---------------------------------|-----------------|----------------|-------------------|----------------|--------|
| | $M \pm m$ | $M \pm \sigma$ | $M \pm m$ | $M \pm \sigma$ | |
| Жизнеспособность Краситель | | | | | |
| DiOC ₆ (3) | 62,3 ± 2,8 | 56,3 – 68,3 | 66,3 ± 3,1 | 57,6 – 75,0 | >>0,05 |
| SYTO16 | 64,7 ± 2,7 | 59,0 – 70,4 | 65,0 ± 2,9 | 51,4 – 78,6 | >>0,05 |
| Rh123 | 65,1 ± 2,6 | 59,6 – 70,6 | 65,4 ± 2,3 | 53,3 – 77,5 | >>0,05 |
| NPA | 62,4 ± 2,8 | 56,3 – 68,5 | 70,0 ± 2,4 | 59,6 – 80,4 | <0,05 |

Примечание: $M \pm \sigma$ – 95%-ный доверительный интервал, где σ – среднее квадратичное отклонение; достоверность различий между распределениями образцов (относительно 95%-ного интервала) по жизнеспособности сперматозоидов при уровнях ХГЧ выше и ниже 25 мМЕ/мл сравнивали по критерию χ^2 .

Снижение жизнеспособности в ходе криоконсервации не связано прицельно ни с одним из рассматриваемых признаков раннего апоптоза, выявляемых набором использованных красителей, на что указывает равномерно высокий показатель W Кендалла для всех красителей, его высокая плотность и достоверность (для всех красителей $p < 0,001$). При этом следует учитывать, что

столь высокие значения W (от 0,722 для DiOC₆(3) до 0,790 для NPA) являются следствием прямого сопоставления результатов для нативного контроля (среда 1) и клеток, прошедших процедуру криоконсервации (среды 2-5), что вызывает группировку данных вокруг их средних значений и обеспечивает высокую достоверность распределения.

Материал аликвоты 1 был использован в ходе процедуры ЭКО, что дало возможность ретроспективно сопоставить результаты оценки жизнеспособности нативных сперматозоидов (контроль) с результатами процедуры ЭКО (без применения технологии ICSI). Результаты анализа с применением панели красителей приведены в табл.3. Однозначным критерием наступления беременности считали повышение уровня ХГЧ в сыворотке крови женщины свыше 25 мМЕ/мл через 10 сут после проведения ЭКО, хотя в ряде случаев беременность наступала и при более низких сывороточных уровнях ХГЧ. Результаты табл.3 показывают, что достоверное наступление беременности после ЭКО связано с относительно высокой (свыше 65% по всем методам оценки) жизнеспособностью сперматозоидов.

Таблица 4

Оценка жизнеспособности сперматозоидов нативного эякулята у пациентов различных возрастных групп методом проточной цитометрии, %%, $M \pm m$

| Краситель | Возрастные группы | | |
|-----------------------|----------------------------------|--------------|--------------|
| | 26 – 29 лет | 30 – 34 года | более 35 лет |
| | <i>живые клетки</i> | | |
| DiOC ₆ (3) | 59,2 ± 2,8 | 54,4 ± 5,2 | 49,0 ± 5,0 |
| Syto16 green | 55,2 ± 5,6 | 58,3 ± 4,9 | 50,5 ± 5,4 |
| Родамин 123 | 57,7 ± 5,2 | 52,7 ± 6,1 | 49,0 ± 5,4 |
| NPA | 57,1 ± 5,5* | 50,9 ± 6,5 | 47,4 ± 6,2* |
| | <i>клетки в раннем апоптозе</i> | | |
| DiOC ₆ (3) | 4,5 ± 0,6* | 6,5 ± 1,8 | 8,5 ± 2,0* |
| Syto16 green | 6,9 ± 0,7 | 7,8 ± 1,0 | 7,5 ± 0,9 |
| Родамин 123 | 6,5 ± 3,1 | 7,3 ± 1,4 | 7,9 ± 2,1 |
| NPA | 6,6 ± 3,5 | 7,9 ± 2,8 | 8,4 ± 2,3 |
| | <i>клетки в позднем апоптозе</i> | | |
| DiOC ₆ (3) | 36,1 ± 2,8 | 39,1 ± 4,6 | 42,5 ± 4,0 |
| Syto16 green | 34,8 ± 4,6* | 37,0 ± 5,4 | 42,6 ± 5,6* |
| Родамин 123 | 35,8 ± 2,9 | 39,7 ± 3,2 | 43,0 ± 4,2 |
| NPA | 36,3 ± 2,9* | 41,2 ± 4,8 | 44,2 ± 5,0* |

Примечание: Различия между распределениями показателей разных возрастных групп, обозначенных в строке таблицы знаком *, достоверны согласно U -критерию при $p < 0,05$.

Возрастные изменения жизнеспособности сперматозоидов. Оценка возрастной динамики жизнеспособности сперматозоидов представляет важные сведения о патофизиологических механизмах развития мужского бесплодия в возрастном аспекте. Результаты оценки жизнеспособности приведены в табл. 4.

Из представленных данных видно, что по результатам использования всех красителей живые клетки составляют немного больше половины от общего числа клеток у лиц 26-29 лет и несколько менее 50% у лиц старше 35 лет. На сходный уровень снижения жизнеспособности указывают результаты окрашивания DIOC₆(3) и Rh123: от 57-59% живых клеток у лиц в возрасте 26-29 лет до 49% для обоих красителей у лиц старше 35 лет. Результат указывает, что энергетический аппарат клетки и акросомальный комплекс, который отражает уровень внутриклеточного транспорта и функционирование аппарата Гольджи, затрагиваются с возрастом в равной степени и параллельно. Окрашивание SYTO16 green указывает, что плотность упаковки хроматина при переходе от 26-29 лет к 35 годам и старше также уменьшается, что приводит к снижению доли живых клеток по окраске этим красителем от 55,2 до 50,5%. Однако окрашивание NPA указывает на снижение доли живых клеток с 57,1 до 47,4% клеток, что отражает состояние наружной мембраны и распознающего аппарата сперматозоида.

Связывание красителей со сперматозоидами указывает, что после 26 лет быстро развиваются возрастные изменения, затрагивающие как состояние акросомы спермия и плотность упаковки его ДНК (краситель Rho123), так и состояние энергетического аппарата гамет: окрашивание зондом DIOC₆(3) свидетельствует об ослаблении энергетической эффективности митохондрии примерно на 1% в год (табл. 4). О таком же повышении проницаемости мембраны митохондрии свидетельствует и окрашивание Syto16 green. По результатам окрашивания всеми красителями в эякуляте с возрастом неуклонно возрастает доля клеток в обратимой фазе раннего апоптоза и необратимом позднем апоптозе.

Падение концентрации сперматозоидов в эякуляте, уменьшение их подвижности (табл.1), сопровождающееся понижением жизнеспособности гамет (табл.4) приводит к снижению их главной функции – оплодотворяющей способности – даже в условиях ЭКО со скоростью 2% в год: от 88% в возрасте до 30 лет к 61% после 35 лет (табл.1). Существенно, что доля получаемых в результате ЭКО TQ-эмбрионов сокращается от 60 до 44% после 30 лет и в дальнейшем остается примерно на этом уровне. Это сопровождается снижением вероятности наступления беременности от 44% в возрасте 26-29 до 38% в период 30-34 лет и к существенному падению показателя (до 21% и ниже) после 35 лет.

В табл. 5 приведены результаты математической обработки результатов криоконсервации сперматозоидов лиц разных возрастов в случае использования

различных консервирующих сред. В табл. 5 обобщены данные только для случая для живых клеток, из анализа результатов которой видно, что наилучшие условия криоконсервации, которые обеспечивали минимальное снижение жизнеспособности сперматозоидов, чаще всего связаны с применением среды 3, которая максимально обеспечивала сохранение целостности и потенциала митохондрий, оптимальные условия сохранения хроматина, целостность акросомального аппарата и отсутствие повреждения гликокаликса и распознающего аппарата сперматозоида. Но для возрастной группы 35-47 лет наивысшая сохранность клеток в ходе криоконсервации чаще всего была связана с применением среды 5.

Таблица 5

Оценка влияния различных сред для криоконсервации на показатели жизнеспособности сперматозоидов человека, число раз снижения показателя после криоконсервации

| Среда | Возрастные группы | | |
|--|-------------------|------------|-----------|
| | 26-29 лет | 30-34 года | 35-47 лет |
| влияние на мембранный потенциал митохондрий (краситель DIOC ₆ (3)) | | | |
| 2 | 2,39 | 2,34 | 2,66 |
| 3 | 2,13 ♦, ⊕ | 2,16 ⊕ | 2,45 |
| 4 | 3,13 | 3,94 | 4,12 |
| 5 | 2,42 | 2,34 | 2,28 ⊕ |
| влияние на упаковку ядерного хроматина и целостность мембраны (краситель Syto16 green) | | | |
| 2 | 2,54 | 2,75 | 2,81 |
| 3 | 2,13 ♦, ⊕ | 2,34 | 2,52 |
| 4 | 3,76 | 4,66 | 6,82 |
| 5 | 2,66 | 2,33 ⊕ | 2,44 ⊕ |
| влияние на состояние акросомального аппарата (краситель Родамин123) | | | |
| 2 | 2,60 | 2,69 | 3,68 |
| 3 | 2,00 ♦, ⊕ | 2,19 ⊕ | 2,59 ⊕ |
| 4 | 3,85 | 4,62 | 7,00 |
| 5 | 2,84 | 2,42 | 2,68 |
| влияние на состояние и плотность гликокаликса (краситель NPA) | | | |
| 2 | 2,71 | 2,61 | 2,80 |
| 3 | 2,30 ⊕ | 2,15 ♦, ⊕ | 2,46 |
| 4 | 3,78 | 4,21 | 5,85 |
| 5 | 2,66 | 2,33 | 2,44 ⊕ |

Примечание: ♦ - наименьшее снижение для данной методики оценки жизнеспособности; ⊕ - наименьшее снижение жизнеспособности по возрастной группе.

Влияние иммунохимических показателей семенной плазмы на способность сперматозоидов к оплодотворению. По результатам ИФА было установлено, что уровень ИЛ-8 в Группе 1 (пациенты с нормальным и высоким процентом оплодотворения, более 50%) варьировал в пределах от 156 до 1170 пг/мл. При этом среднее значение концентрации ИЛ-8 по группе составило 361 пг/мл (Рис.3). Параллельно в Группе 2 (пациенты с низким (менее 50%) процентом или отсутствием оплодотворения) этот показатель варьировал в пределах от 0 до 480 пг/мл при среднем значении 427 пг/мл. Уровень С3 в семенной плазме пациентов из Группы 1 варьировал в пределах от 20 до 7756 нг/мл. При этом среднее значение концентрации С3 по группе составило 3750 нг/мл. Одновременно с этим в Группе 2 показатель варьировал в пределах от 0 до 2168 нг/мл при среднем значении 782 нг/мл. Уровень ИЛ-6 в Группе 1 варьировал в пределах от 50 до 684 пг/мл. При этом среднее значение концентрации ИЛ-6 по группе составило 271 пг/мл. В Группе 2 этот показатель варьировал в пределах от 0 до 400 пг/мл при среднем значении 185 пг/мл. Наконец, уровень ИЛ-1 β в Группе 1 варьировал в пределах от 50 до 286 пг/мл. При этом среднее значение концентрации ИЛ – 1 β по группе составило 169 пг/мл, а в Группе 2 этот показатель варьировал в пределах от 0 до 356 пг/мл при среднем значении 171 пг/мл. Уровень АМГ в семенной плазме варьировал в Группе 1 в пределах от 87 до 15934 пг/мл. При этом среднее значение концентрации АМГ по группе составило 712 пг/мл. Одновременно в Группе 2 этот показатель варьировал от 0 до 5954 пг/мл при среднем значении 902 пг/мл (Рис. 3).

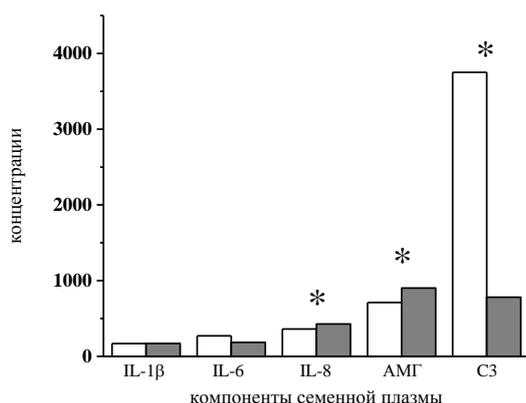


Рис. 3. Средние значения концентрации ряда компонентов семенной плазмы у пациентов исследуемых групп по результатам иммуноферментного анализа

По оси абсцисс: компоненты семенной плазмы; по оси ординат: концентрации, для всех – пг/мл, для С3 – нг/мл. Белые столбики – Группа 1, серые столбики – Группа 2. * - различия между группами достоверны по *W*-критерию Уайта при $p < 0,05$.

Обработка полученных результатов с использованием *W*-критерия Уайта показала, что между группами пациентов с высоким и низким процентом оплодотворения существуют достоверные различия по концентрациям АМГ, ИЛ-8 и С3 компонента комплемента в семенной плазме и не существует различий по распределению концентраций ИЛ-1 β и ИЛ-6, поэтому последние два цитокина были исключены из дальнейшего анализа. Однако приведенные результаты не

указывают на значимость того или иного показателя для эффективности оплодотворения. Для оценки зависимости качества оплодотворения от уровней факторов, по которым установлены достоверные различия между группами, был проведен корреляционный анализ, в ходе которого анализировали соотношения между уровнем оплодотворения у конкретного пациента и концентрациями диагностически значимых цитокинов (АМГ, IL-8 и С3). Согласно *W*-критерию Уайта, в Группе 1 не наблюдалось достоверной зависимости качества оплодотворения от концентраций АМГ, IL-8 и С3. Напротив, в Группе 2 была выявлена достоверная обратная корреляционная зависимость процента оплодотворения от концентрации С3 в семенной плазме (табл.6).

Таблица 6

Значения коэффициентов корреляции *r* между индивидуальными уровнями факторов семенной плазмы и способностью сперматозоидов к оплодотворению

| Группы | Значения <i>r</i> | АМГ | IL-8 | С3 |
|----------|-------------------|------------|-------------|-------------------|
| Группа 1 | <i>r</i> | -0,33±0,24 | 0,163±0,247 | -0,15±0,25 |
| | <i>p</i> | >0,05 | >0,05 | >0,05 |
| Группа 2 | <i>r</i> | -0,44±0,40 | -0,32±0,42 | -0,70±0,36 |
| | <i>p</i> | >0,05 | >0,05 | <0,05 |

Найденная статистическая зависимость между высокой вероятностью успеха ЭКО и наступления беременности и высоким содержанием С3 компонента комплемента в семенной плазме и обратное соотношение в случае низкого уровня С3 в СП (рис.3 и табл. 6). представляется важной с точки зрения прогнозирования результатов ЭКО. Этот факт может иметь два возможных объяснения. С одной стороны, низкий уровень синтезируемого в печени С3 может иметь возрастной характер, либо отражать обширные физиологические (возрастные) перестройки в организме, быть следствием длительного воздействия экзогенных токсикантов, а также отражать индивидуальную генетически детерминированную предрасположенность к недостаточному синтезу С3. С другой стороны, С3 является не только компонентом каскада комплемента, но и одним из эффективных опсоинов, поэтому сопряженная с его высоким уровнем в СП высокая вероятность оплодотворения и беременности может быть результатом эффективной опсонизации и элиминации сперматозоидов в апоптозе, что автоматически повышает концентрацию их прогрессивно-подвижных жизнеспособных форм и существенно повышает вероятность успешного ЭКО.

Статистический анализ результатов исследования показал, что полученные результаты доказывают влияние на результаты ЭКО таких факторов, как концентрация эякулята, содержание жизнеспособных сперматозоидов при окрашивании лектином нарцисса или средний показатель при окрашивании всеми красителями. При этом наблюдаемые взаимосвязи

насилии максимально физиологический характер, когда в ходе ЭКО не использовалась технология ICSI.

Зависимость вероятности наступления беременности по данным анализа крови на ХГЧ от различных факторов была рассмотрена дополнительно при построении прогностической модели методом бинарной логистической регрессии. В результате статистической обработки данных, после исключения незначущих или коррелирующих между собой факторов, нами была получена следующая формула (1).

$$P = 1/(1 + e^{-z}); \quad \text{где } z = 3,118 + 1,455x_1 - 0,218x_2 + 0,053x_3, \quad (1),$$

где P – вероятность наступления беременности, подтвержденной результатами анализа на ХГЧ, x_1 – наличие ICSI (0 – не проводилась, 1 – проводилась), x_2 – возраст пациента (полных лет), x_3 – доля высококачественных эмбрионов TQ (%). Исходя из полученных коэффициентов, проведение ICSI увеличивает вероятность наступления беременности, подтвержденной результатами анализа крови на ХГЧ, и обеспечивает высокую долю эмбрионов TQ. Напротив, возраст пациента является фактором, снижающим вероятность указанного события. Значение χ^2 для данной модели составило 10,88, что при числе степеней свободы $f = 3$ соответствует уровню значимости $p = 0,012$. Исходя из значения R^2 Найджелкерка, полученная функция объясняет 43,6% дисперсии вероятности наступления беременности в результате ЭКО.

Таблица 7

Результаты классификации исследуемых по вероятности наступления беременности, подтвержденной анализом крови на ХГЧ, в зависимости от значений функции (1)

| Показатель | Факт наступления подтвержденной беременности | Предсказанная вероятность наступления беременности | | Итого |
|----------------------|--|--|---------|-------|
| | | отсутствие | наличие | |
| Абс. число пациентов | отсутствие | 27 | 6 | 33 |
| | наличие | 6 | 15 | 21 |
| Доля пациентов, % | отсутствие | 81,8 | 18,2 | 100,0 |
| | наличие | 28,6 | 71,4 | 100,0 |

Разделяющее значение логистической функции было принято за 0,45, что обеспечило сочетание наивысших значений чувствительности и специфичности прогностической модели. Соответственно, при расчетных значениях функции P менее 0,45 пациенты относились к категории низкой вероятности наступления беременности в результате ЭКО. При значениях P более 0,45 можно предполагать высокую вероятность наступления беременности. Результаты классификации пациентов по вероятности наступления беременности при помощи модели (1) представлены в табл.7.

Диагностическая эффективность данной модели, соответствующая доле верных прогнозов наступления беременности среди всех исследуемых,

составила 77,8% (42 случая из 54). Чувствительность используемой логистической функции, определяемая как доля правильно предсказанных случаев наступления беременности, подтвержденной результатами анализа на ХГЧ, составила 71,4% (15 случаев из 21). Специфичность модели, соответствующая доле верных прогнозов о ненаступлении беременности в результате ЭКО, составила 81,8% (27 случаев из 33).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов проведенного исследования разработан новый метод цитометрической оценки жизнеспособности сперматозоидов человека, основанный на выявлении манноза-терминальных углеводов гликокаликса сперматозоидов. Физиологическим обоснованием данного метода являются результаты изучения патофизиологической последовательности событий в сперматозоидах, ведущих к снижению их функции. Снижение мембранного потенциала митохондрии сперматозоида, выявленное с помощью красителя DIOC6(3), очень быстро приводит к утрате части структур гликокаликса сперматозоидов, уменьшению заряда на нем и открытию Ман-содержащих углеводов, лежащих в нижних слоях гликокаликса всех животных клеток. Открывающиеся на этой стадии раннего апоптоза Ман-терминальные структуры выявляются с помощью Ман-специфичного лектина нарцисса желтого, на применении которого основан новый запатентованный метод оценки жизнеспособности сперматозоидов человека. Последующие этапы снижения жизнеспособности человека включают снижение плотности упаковки хроматина в ядре спермия, выявляемую при окрашивании Родамином-123, что в дальнейшем приводит к фрагментации ДНК, и разрушение внутренних мембран гаметы, что приводит к разрушению акросомы и выявляется при окрашивании красителем SYTO16 green. Две последних стадии патологического процесса свидетельствуют о необратимом переходе значительной части сперматозоидов клеток в поздний апоптоз и всегда сопровождают развитие мужского бесплодия.

Аналогичные изменения происходят и с возрастом. Так, в возрастном интервале 26 – 47 лет энергетический потенциал сперматозоидов ежегодно снижается на 1%, а их оплодотворяющая способность – на 2%. Снижение энергетической функции митохондрии сперматозоида всегда сопровождается появлением на мембране клетки Ман-терминальных углеводов. Аналогичные изменения происходят при криоконсервации сперматозоидов, после которой жизнеспособность мужских гамет и их оплодотворяющая способность падают примерно в 2 раза вне зависимости от состава и свойств консервирующих сред и всегда связаны со снижением функции митохондрии сперматозоида и изменениями в его гликокаликсе.

Результаты работы показали также зависимость вероятности оплодотворения от уровня СЗ компонента комплемента в семенной плазме: вероятность оплодотворения был тем ниже, чем ниже был уровень СЗ. Этот

результат подтверждает как важную роль С3 компонента комплемента в процессе оплодотворения, так и указывает на его возможную функцию в патогенезе мужского бесплодия, связанную с опсонизацией сперматозоидов, находящихся в позднем апоптозе. Опсонизация нежизнеспособных клеток повышает концентрацию полноценных клеток, что, по результатам исследования, приводит к повышению вероятности оплодотворения на 0,17% при росте концентрации жизнеспособных клеток на 1 млн в 1 мл эякулята.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный метод оценки жизнеспособности сперматозоидов с использованием меченого лектина луковиц Нарцисса желтого (*Narcissus pseudonarcissus* L.) в ходе проточной цитометрии обеспечивает получение результатов, позволяющих предсказать вероятность успешного проведения экстракорпорального оплодотворения.

2. Между показателями концентрации сперматозоидов в эякуляте и их жизнеспособностью существует прямая линейная зависимость: увеличение концентрации сперматозоидов на 1 млн/мл обеспечивает рост содержания жизнеспособных сперматозоидов в нативном эякуляте на 0,17%.

3. Падение потенциала митохондрии сперматозоида и вызванное им изменение состава углеводов и заряда гликокаликса сперматозоида всегда предшествуют другим изменениям гамет и являются самым жестким критерием их жизнеспособности. Снижение жизнеспособности сперматозоидов последовательно проявляется в снижении функции митохондрии, изменении состава углеводов гликокаликса, плотности упаковки хроматина и нарушениях его акросомального комплекса.

4. Криоконсервация сперматозоидов ведет к снижению их жизнеспособности по меньшей мере в 2 раза. Выбор среды для криоконсервации сперматозоидов должен производиться с учетом возраста донора клеток.

5. Снижение жизнеспособности сперматозоидов носит возрастной характер. В возрастном интервале 26 – 47 лет энергетический потенциал сперматозоидов ежегодно снижается на 1%, а их оплодотворяющая способность – на 2%, от 88% в возрасте до 30 лет к 61% после 35 лет.

6. Низкая вероятность оплодотворения и наступления беременности прямо коррелирует с низким уровнем С3 компонента комплемента в семенной плазме. Концентрации IL-1 β , IL-6, IL-8 и антимюллеровского гормона не оказывают влияния на вероятность оплодотворения в ходе процедуры ЭКО.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Патенты РФ:

1. Доценко А.А., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Полевщиков А.В. "Способ определения жизнеспособности сперматозоидов человека" Патент №2689791 от 29.05.2019 г.

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. **Доценко А.А.**, Полевщиков А.В. Влияние иммунохимических показателей семенной плазмы на способность сперматозоидов к оплодотворению // Росс. аллерг. журнал. - 2013.- №2, ч.2.- С. 89- 91.
2. **Доценко А.А.**, Полевщиков А.В. Значение комплексной оценки уровней антимюллеровского гормона, интерлейкина-8 и С3 компонента комплемента в семенной плазме для прогнозирования способности сперматозоидов к оплодотворению // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. – С.138-146; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25386>
3. Серебрякова М.К., **Доценко А.А.**, Кудрявцев И.В, Полевщиков А.В. Скрининг панели лектинов для оценки стадий апоптоза тимоцитов мыши // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19. – № 3. – С. 57–70. <https://doi.org/10.17816/MAJ19357-70>
4. **Доценко А.А.**, Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Сухачев А.Н., Полевщиков А.В. Сравнение цитометрических методов оценки жизнеспособности нативных и криоконсервированных сперматозоидов человека // Медицинский академический журнал. – 2020. – Т. 20. – № 1. – С. 83–92. <https://doi.org/10.17816/MAJ19286>
5. **Dotsenko A.A.**, Polevshchikov A.V. Pathophysiological and age-specific mechanisms of morpho-functional changes in spermatozoa in infertility // Медицинский академический журнал. – 2020. – Т. 20. – № 4. – С. 17–26. <https://doi.org/10.17816/MAJ58099>
6. **Доценко А. А.**, Серебрякова М. К., Кудрявцев И. В., Полевщиков А. В. Возрастные изменения спермограммы и оплодотворяющей способности сперматозоидов у лиц 26-47 лет //Успехи геронтологии. – 2021. – Т. 34. - № 1 – С. 96 – 101. <https://doi.org/10.34922/AE.2021.34.1.013>

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМГ – антимюллеровский гормон; **ВОЗ** – Всемирная Организация Здравоохранения; **ЗФР** – забуференный физиологический раствор; **СП** – семенная плазма; **ХГЧ** – хорионический гонадотропин человека; **ЭКО** – экстракорпоральное оплодотворение; **С3** – компонент комплемента С3; **DiOC₆(3)** – краситель йодид 3,3'-дигексилосакарбоцианина; **FCS** – фетальная телячья сыворотка; **FITC** – флуоресцеинизотиоцианат; **FS** – прямое светорассеяние; **ICSI** – метод интрацитоплазматического введения сперматозоида (*IntraCytoplasmic Sperm Injection*, ICSI), один из вариантов ЭКО; **IL** – интерлейкин; **NPA** – лектин нарцисса; **PI** – йодид пропидия; **Rh123** – родамин-123; **SS** – боковое светорассеяние; **SYTO16 green** – краситель SYTO16 green