

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

ДОЦЕНКО
Анна Андреевна

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

3.3.3. Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель
Доктор биологических наук
профессор
Полевщиков Александр Витальевич

Санкт-Петербург
2021

Оглавление

	Стр.
Оглавление	2
Введение	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1.1. Общий анализ проблемы мужского бесплодия	12
1.2. Морфо-функциональные изменения сперматозоидов при бесплодии	15
1.2.1. Причины и механизмы альтерации сперматозоидов	15
1.2.2. Изменения морфологии и функциональных характеристик сперматозоидов при бесплодии	18
1.3. Возрастные изменения структуры и свойств сперматозоидов	21
1.3.1. Анализ возрастных изменений спермограммы	21
1.3.2. Вероятные причины возрастных изменений сперматозоидов	23
1.4. Экстракорпоральное оплодотворение: краткий анализ теории и практики метода лечения мужского бесплодия	26
1.5. Изменения состава семенной плазмы при мужском бесплодии	29
1.5.1. Компоненты комплемента семенной плазмы	30
1.5.2. Факторы роста, цитокины, интерлейкины	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	36
2.1. Характеристика больных	36
2.2. Получение материала	37
2.3. Анализ спермограммы	37
2.4. Получение семенной плазмы	38
2.5. Криоконсервация сперматозоидов	38
2.5.1. Криоконсервация с использованием среды Квина	39
2.5.2. Криоконсервация с использованием набора Sperm Freezing Medium	39
2.5.3. Криоконсервация с использованием набора Freezing Medium	40

2.5.4. Криоконсервация с использованием раствора Spermfreeze Solution	40
2.6. Лектин	40
2.7. Использование метода проточной цитометрии для оценки жизнеспособности сперматозоидов	40
2.7.1. Пробоподготовка для проточной цитометрии и проведение анализа	41
2.7.1.1. Использование DiOC ₆ (3) для оценки мембранного потенциала митохондрий	42
2.7.1.2. Использование SYTO16 green для оценки целостности мембраны и плотности упаковки его ядерного хроматина	44
2.7.1.3. Использование Родамин-123 для оценки состояния акросомального аппарата и митохондрий	46
2.7.1.4. Использование нового способа определения жизнеспособности сперматозоидов с использованием меченного FITC лектина нарцисса	47
2.7.2. Обработка результатов цитометрического анализа	48
2.8. Оценка уровней IL-1 β , IL-6, IL-8, С3 компонента комплемента и антимюллеровского гормона в семенной плазме методом иммуноферментного анализа	48
2.9. Методы статистического анализа	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
3.1. Параметры спермограммы у пациентов разных возрастных групп	55
3.2. Оценка жизнеспособности сперматозоидов человека методом проточной цитометрии	59
3.2.1. Сопоставление способности химических зондов и NPA к окрашиванию апоптотических клеток	59
3.2.2. Применение метода цитометрического учета для оценки жизнеспособности сперматозоидов после криоконсервации	63
3.3. Возрастные изменения жизнеспособности сперматозоидов	68

3.4. Влияние иммунохимических показателей семенной плазмы на способность сперматозоидов к оплодотворению	77
3.5. Статистический анализ результатов исследования	81
3.5.1. Спермограмма	81
3.5.2. Сравнительный анализ методов оценки жизнеспособности сперматозоидов	82
3.5.3. Оценка результатов ЭКО в зависимости от показателей состояния эякулята	88
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	97
4.1. Информативность показателей спермограммы при прогнозировании результатов ЭКО	97
4.2. Оценка жизнеспособности сперматозоидов и прогнозирование результатов ЭКО	100
4.3. Возрастной аспект мужского бесплодия и прогнозирование результатов ЭКО	103
4.4. Изменения состава семенной плазмы и прогнозирование результатов ЭКО	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
Выводы	110
Список сокращений	111
Список литературы	113

ВВЕДЕНИЕ

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 [69]. В Российской Федерации проблема является ещё более острой, что осложняет и без того неблагоприятную демографическую ситуацию. На основании обобщения результатов различных скрининговых исследований, 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 [3,19,33].

Единой классификации причин, вызывающих развитие мужского 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 [83], методическими сложностями в работе с материалом [68,91], проблемами его криоконсервации [60], оценкой перспектив и целесообразности применения различных вариантов ЭКО [78,112].

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 [65].

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 [31].

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 [51] (или с помощью гипоосмотического набухания (HOS – тест) [75]. 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 [38], 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

Существенное теоретическое значение для патофизиологии имеет получение клинико-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.

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.

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: 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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Общий анализ проблемы мужского бесплодия

Согласно определению ВОЗ, бесплодием считается отсутствие наступления беременности у женщины в течение 1 года и более в сексуально активной паре, не использующей методы контрацепции [120]. Данная проблема имеет всемирный характер, во всех развитых странах до 20% семейных пар страдает от отсутствия детей, при этом половина случаев бесплодия приходится на мужское бесплодие [69,120]. 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% мужчин в РФ имеют нарушенную фертильность, что отражает возрастающее воздействие на организм психоэмоциональных нагрузок, воздействие неблагоприятных экологических, производственных и бытовых факторов [3,19,33].

Единой классификации причин, вызывающих развитие мужского бесплодия, не существует. Чаще других в качестве основы для классификации форм мужского бесплодия рассматривают этиологические факторы, патогенетические механизмы формирования, топологический уровень поражения, методы лечения [4]. Другой подход предусматривает разделение мужского бесплодия секреторное бесплодие (связанное с нарушением сперматогенеза в результате гормональных нарушений центрального и периферического уровней) и экскреторное бесплодие (сформированное по причине заболеваний, связанных с нарушением выведения эякулята) [33].

Основными этиологическими факторами мужского бесплодия считают варикоцеле, урогенитальные инфекции, иммунологические факторы, врожденные аномалии развития, внешние физические и химические неблагоприятные факторы, а также эндокринные нарушения, сексуальные дисфункции и идиопатические нарушения. Под идиопатическими

нарушениями понимают отклонения неясного генеза, не подпадающие под другие указанные факторы. С годами идиопатические нарушения могут манифестироваться в патофизиологические механизмы мужского бесплодия, основанные на одном или нескольких указанных факторах [26]. Примечательно, что доля тех или иных этиологических факторов существенно различается в России и за рубежом. Так, в Европе с большим отрывом лидируют идиопатические нарушения (более 75% случаев мужского бесплодия), за ними следуют варикоцеле (12%), урогенитальные инфекции (до 7%), а на иммунологические и внешние неблагоприятные факторы приходится около 3% случаев. В России также уверенно лидируют идиопатические нарушения, хотя их уровень (38%) в 2 раза меньше, чем в Европе, при этом урогенитальные инфекции удерживают второе место, их вклад которых в развитие бесплодия оценивается в 32%. Далее следуют варикоцеле (27,5%), иммунологические факторы (17,5%), врожденные аномалии развития и неблагоприятные внешние факторы (около 7% в обоих случаях). Вклад сексуальных дисфункций и эндокринных нарушений в развитие мужского бесплодия в России оценивается в 0,5 и 2,5%, соответственно [11,34]. При этом среди российских специалистов нет единства относительно значения тех или иных этиологических факторов мужского бесплодия: если в работах В.А.Божедомова и соавторов доля иммунологических факторов оценивается в 17,5% [11], то в работах В.Н.Ширшова – только в 2,5%, повторяя данные для Европы [34].

Идиопатические нарушения, ведущие к развитию мужского бесплодия, являются самой частой причиной заболевания как в России, так и в мире в целом, однако именно эту группу нарушений очень трудно исследовать в силу неясности генеза и, вероятно, составного характера данной патологии. Проблема урогенитальных инфекций, сопровождающихся, как правило, развитием простатита будет подробнее рассмотрена в данном обзоре в связи с ролью семенной плазмы в развитии мужского бесплодия. При этом проблема простатита заслуживает самостоятельного исследования и не

входит в задачи данной работы, хотя эта проблема пока ещё далека от своего решения, о чем свидетельствует анализ литературы [5]. Проблема варикоцеле – варикозного расширения вен яичка, – предусматривающая хирургическое лечение [2] и связанных с ним патофизиологических изменений семенника и созревающих сперматозоидов, а также иммунологические аспекты мужского бесплодия будут подробнее рассмотрена в следующем разделе данного обзора.

Из прочих этиологических факторов мужского бесплодия чаще других упоминается ожирение, типичным следствием которого является эректильная дисфункция [13,50,106]. Ключевым звеном патогенеза васкулогенной эректильной дисфункции и ожирения является нарушение функции эндотелия сосудов. Другими связующими звеньями между ожирением и ЭД являются высокий уровень свободных жирных кислот и адипокинов в крови, выраженность системного воспаления, оксидативного стресса и инсулинорезистентности. В случае эндотелиальной дисфункции снижение продукции оксида азота (NO) вызывает нарушение реактивности гладкой мускулатуры сосудов, затрудняя ее переход от сокращения к расслаблению [66]. Ожирение часто ассоциировано с изменением уровня половых гормонов, при этом точные механизмы патогенеза гипогонадизма при ожирении сложны и до конца не изучены [13].

Параллельно было показано, что длительно существующее ожирение снижает продукцию тестостерона клетками Лейдига и приводит к их разрушению, что является результатом повышения уровня провоспалительного цитокина TNF- α и активности макрофагов. Ожирение снижает интратестикулярный уровень тестостерона из-за воздействия лептина, а также приводит к подавлению экспрессии гена цитохрома p450, участвующего в синтезе тестостерона [113]. Всё это не может не сказаться на показателях спермограммы, морфологии и функциональном состоянии сперматозоидов [70,105].

1.2. Морфо-функциональные изменения сперматозоидов при бесплодии

1.2.1. Причины и механизмы альтерации сперматозоидов

Для анализа причин и патофизиологических механизмов альтерации сперматозоидов, ведущих к развитию мужского бесплодия, целесообразно применить разделение причин бесплодия на секреторные и экскреторные [5,33], хотя иногда выделяют также секреторно-экскреторные причины бесплодия [30]. Отдельную группу составляют генетически обусловленные пороки развития, связанные точечными мутациями или хромосомными aberrациями и ведущие к аномалиям структуры репродуктивных органов и различным тяжелым отклонениям процесса сперматогенеза как в секреторной, так и экскреторной формах. Дальнейший анализ касается наиболее широкой группы причин и механизмов секреторной формы мужского бесплодия.

Секреторная форма бесплодия связана с недостаточностью ткани семенника и может быть врожденной (вследствие недоразвития гонад), или приобретенной, вызванной недостаточностью гонад, связанных с действием различных факторов [30]. Общим и едва ли не ключевым фактором развития секреторной формы мужского бесплодия является нарушение целостности гемато-тестикулярного барьера, которое всегда приводит к альтерации тканей, повреждению гамет на разных стадиях развития, хроническому воспалению и аутоиммунному поражению гамет и семенников [31].

Практически все перечисленные в разделе 1.1. данного обзора причины мужского бесплодия сопровождаются нарушениями целостности гемато-тестикулярного барьера, развитием хронического воспаления и накоплением в тканях семенников активных форм кислорода (АФК). Здесь дополнительных доказательств не требует роль курения, алкоголя и токсических факторов окружающей среды, вызывающих патологическое повышение проницаемости эндотелия капилляров, гибель клеток эндотелия, проникновение АФК и нейтрофилов в окружающую семенные канатики интерстициальную ткань [12,13].

К нарушению целостности гемато-тестикулярного барьера ведет и наличие варикоцеле, при котором наблюдается ухудшение трофики клеток семенных канальцев и эндотелия сосудов и повреждение последних накапливающимися кислородными радикалами [15,20]. Аналогичная картина складывается и при ожирении, наличие которого также ведет к венозному застою и накоплению перекисных радикалов, которые в данном случае будут представлены как АФК, так и продуктами перекисного окисления липидов [13,39,59,98].

Патологическое повышение проницаемости гемато-тестикулярного барьера является неотъемлемой чертой простатита инфекционного и неинфекционного генеза [5]. В случае наличия вирусных или бактериальных (как гонококковой, так и негонококковой природы) патогенов повышение проницаемости гемато-тестикулярного барьера является следствием ослабления плотности контактов между клетками эндотелия сосудов под действием цитокинов воспаления (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) [17]. Неотъемлемой чертой острого воспаления, который охватывает не только простату, но и гонады является и продукция АФК [101]. Результатом хронизации процесса становится замещение железистой ткани простаты волокнистой соединительной тканью, что резко ухудшает качество спермы и затрудняет эвакуацию сперматозоидов. Этот вариант заболевания совпадает с патогенезом стерильного (застойного) простатита, чертами которого являются также массовая гибель сперматозоидов и миграция нейтрофилов в простату и семявыносящие пути, что ведет к появлению гнойного секрета и локальной продукции АФК [21]. Результатом вновь становится повышение проницаемости гемато-тестикулярного барьера, повреждение гамет и развитие бесплодия [6]. Эти исследования также подводят базу под поиск новых способов фармакологической коррекции уровня АФК [7].

Альтерация тканей, острое и хроническое воспаление, активация фагоцитов становятся этапами начала аутоиммунной атаки сперматозоидов и семенников в целом. Этот вопрос был поставлен, когда гонады были

отнесены к забарьерным органам для иммунной системы и описаны аутоиммунные формы орхита [25]. Однако в последние годы данное направление исследований стало одним из наиболее популярных направлений в изучении механизмов мужского бесплодия. Появились современные исследования высокого уровня, материалы которых доказывают все этапы развития аутоиммунных реакций, направленных на сперматозоиды и гонады в целом: от процессинга и презентации аутоантигенов до формирования аутоантител [9,10,22].

Результаты российских и иностранных авторов показали, что формирующиеся аутоиммунные состояния могут быть отнесены к аллергическим реакциям II и III типа по классификации Джелла и Кумбса. В ходе реакций II типа формируются антиспермальные антитела, относящиеся главным образом к классам IgA и IgG, при этом диагностическую ценность по данным отечественных авторов имеют преимущественно IgG-аутоантитела [10]. В этой связи критического анализа требуют результаты зарубежных авторов, подчеркивающие роль антиспермальных IgA антител в развитии патологии [90]. По-видимому, способностью связываться со сперматозоидами обладают аутоантитела обоих классов, что существенно скажется на подвижности гамет и приведет к их агглютинации. Однако антитела класса IgA не способны активировать классический каскад комплемента, поэтому их повреждающее действие не будет критичным. Тем более, что в кислой среде влагалища и матки в ходе оплодотворения значительная часть иммунных комплексов распадется. Напротив, антитела класса IgG способны не только связываться с аутоантигенами, но и активировать классический путь комплемента [35], а также после формирования больших иммунных комплексов, к числу которых несомненно относятся и сперматозоиды, запускать аллергические реакции III типа, связанные с дегрануляцией нейтрофилов. В свою очередь, активация и дегрануляция нейтрофилов приведет к новому витку продукции АФК и

дальнейшему тканевому повреждению, что также показано в рамках клинико-экспериментальных исследований [10,32].

Связывание аутоантител со сперматозоидом способно ингибировать акросомную реакцию гаметы в ходе оплодотворения и полностью блокировать его оплодотворяющую способность [58], поэтому оценка индуцированной ионофором A23187 акросомной реакции была одной из первых точек использования проточной цитометрии в репродуктологии [24,96].

1.2.2. Изменения морфологии и функциональных характеристик сперматозоидов при бесплодии

Снижение концентрации сперматозоидов и их общего количества в эякуляте рассматривается как важный признак мужской инфертильности. Российские критерии нормы опираются на показатели, рекомендованные ВОЗ [119], составляющие не менее 15×10^6 сперматозоидов в 1 мл спермы (ниже – олигозооспермия) при общем количестве клеток в эякуляте равном 39×10^6 . Между тем, британские и американские критерии нормы гораздо более жесткие: концентрация равная $13,5 \times 10^6$ сперматозоидов в 1 мл трактуется уже как бесплодие, а твердое заключение о фертильности мужчины делается при концентрации клеток свыше 48×10^6 сперматозоидов в 1 мл, что более чем в 3 раза превышает нормы ВОЗ [71]. Другие британские специалисты призывают полностью отказаться от числовых норм концентрации и общего количества сперматозоидов, полностью перейдя к оценке функциональной полноценности материала [83]. Это предложение не мешает этой группе авторов признавать концентрацию сперматозоидов, равной не менее 10^7 активно-подвижных сперматозоидов в 1 мл эякулята критерием фертильности. Однако согласно критериям ВОЗ доля прогрессивно-подвижных форм должна быть не менее 32% (ниже – астенозооспермия), что при нижней границе нормы (по ВОЗ) соответствует концентрации активно-подвижных клеток примерно 5×10^6 в 1 мл. Иным

словами, британские и американские критерии оценки спермограммы по некоторым ключевым показателям в 2-3 раза жестче критериев ВОЗ, принятых и в России.

Приведенные в п.1.2.1. патогенетические факторы оказывают существенное влияние на морфологию мужских гамет, выявляемую при анализе традиционной спермограммы. В норме классическую морфологию спермия должно иметь не менее 4% клеток в эякуляте (меньшая доля именуется тератозооспермией). Как правило, при развитии бесплодия из трех упомянутых выше типичных нарушений (олигозооспермия, астенозооспермия и тератозооспермия) у пациента наблюдаются два, либо все три морфологических признака бесплодия [34].

Влияние отмеченных факторов распространяется не только на морфологию сперматозоида как клетки, но и на структуру его ядра, плотность укладки хроматина, состояние акросомы, состав липидов мембраны и состояние распознающего аппарата клетки. Наиболее подробные описания затрагивают влияние АФК, различных вирусов и аутоантител.

Механизм влияния оксидативного стресса связывают с уменьшением резерва каталазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, NO-синтазы и супероксиддисмутазы под действием АФК. Это ферменты играют важную роль в сперматогенезе, и их дефицит критически сказывается на состоянии хроматина, плотности его укладки и защите ДНК от повреждений [122]. Сперматозоиды, достигшие эпидидимиса, содержат некомпактную нить ДНК, что делает их инертными [107]. Под влиянием перекиси водорода происходит окисление ядерных белков, что обеспечивает уплотнение ДНК, в результате чего сперматозоиды приобретают подвижность [41,42]. Низкие концентрации перекиси водорода также вызывают фосфорилирование тирозина, что увеличивает на мембране сперматозоида зону, в которой сперматозоид связывается с яйцеклеткой [38], в конечном счете, повышая вероятность оплодотворения [40]. Также имеются данные, что присутствие перекиси водорода необходимо для протекания акросомальной реакции, хотя

механизм влияния данной активной формы кислорода не ясен [109]. Результаты российских авторов подтверждают опасность воздействия АФК на созревающие и зрелые сперматозоиды, указывая, что АФК нарушают работу митохондрий и сокращают энергетический резерв клетки, что приводит к снижению подвижности, а также нарушают работу акросомы и уменьшают способность спермиев к пенетрации. Также АФК могут вызывать окислительное повреждение ДНК [12].

Исследования подтвердили существенное влияние герпесвирусов, включая вирусы папилломы, на подвижность сперматозоидов и другие свойства эякулята. Так, в результате анализа эякулята 71 пациента в возрасте от 22 до 44 лет с установленным диагнозом бесплодие, сочетающимся с наличием вируса папилломы (а также с отсутствием других факторов риска) показано, что среди различных вариантов патозооспермии чаще всего выявлялась астенозооспермия (56% случаев). Реже регистрировались астенотератозооспермия (21%) и олигоастенотератозооспермия (16%). Наименьший удельный вес составила олигоастенозооспермия (6%). Патозооспермия в большинстве случаев сочеталась с типами 16, 18, 33 папилломавируса [17]. Сходные результаты были получены у больных бесплодием, инфицированных вирусами герпеса типов 1-7 [92,94].

Наконец, АФК оказывают достоверное влияние на плотность упаковки хроматина и уровень апоптоза сперматозоидов. На основании обследования 433 пациентов из бесплодных пар и 35 фертильных мужчин показано, что активация свободно-радикальных процессов и дисбаланс про- и антиоксидантных систем играют ведущую роль в патогенезе мужского иммунного бесплодия. Существует прямая зависимость между процентом сперматозоидов, позитивных по аутоантителам, продукцией активных форм кислорода и долей мужских гамет с признаками апоптоза, сопровождающегося фрагментацией ДНК [10]. Более того, к бесплодию приводят не только запуск апоптоза и фрагментация ДНК, но и индуцированное АФК изменение соотношения гистоны/протамины в

структуре хроматина, а также нарушения упаковки, что ведет к увеличению риска развития аномалий зародыша и невынашивания беременности [8,36]. Имеются также результаты клинических наблюдений, указывающих на модификацию мембраны сперматозоида и его распознающего аппарата под действием АФК [80].

1.3. Возрастные изменения структуры и свойств сперматозоидов

Данные литературы единодушно подтверждают очевидный факт возрастного снижения мужской фертильности. Именно это доказывается и в совместном анализе членов специальной рабочей группы Европейского Общества Репродуктологии и Эмбриологии Человека (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE Capri Workshop Group), результат которого распространяется не только на мужчин, но и на женщин [48]. Однако в рамках проблемы возрастного снижения мужской фертильности можно выделить два аспекта: первый связан с анализом возрастной динамики показателей спермограммы, а другой – с физиологической и патофизиологической интерпретацией этих данных.

1.3.1. Анализ возрастных изменений спермограммы

Весьма важные результаты для анализа возрастного аспекта мужской фертильности приведены в работе [17]. Они дают представление о числе пациентов разных возрастов, обратившихся за помощью в связи с проблемой бесплодия. На основании анализа большой когорты пациентов, авторы указывают, что доля пациентов до 24 лет составляет всего 1,4%, 24-26 лет – 9,9%, 26-28 лет – 26,8%, 28-30 лет – 9,9%, 30-32 года – 12,7%, 32-34 года – 11,3%, 34-36 лет – 5,6%, 36-40 лет – 7,0%, 40-42 года – 11,3%, свыше 42 лет – 4,2%. По-видимому, такой характер возрастного распределения связан с целым комплексом социально-психологических причин, анализ которых не является целью данного обзора. Тем не менее, следует принять во внимание, что уже после 24 лет пациенты начинают осознавать необходимость

обращения за медицинской помощью в связи с проблемами в репродуктивной сфере. Не меньший интерес представляют и данные авторов о числе сперматозоидов и их подвижности у пациентов: в 56% случаев выявлена астенозооспермия, в 21% случаев – астенотератозооспермия, в 17% - олигоастенотератозооспермия и в 6% случаев – олигоастенозооспермия.

В рамках своего исследования, авторы также оценили влияние различных вирусов папилломы на количество сперматозоидов в 1 мл эякулята, процент прогрессивно-подвижных форм и процент клеток с нормальной морфологией. Следует признать, что только в случае зависимости подвижности сперматозоидов от числа типов вирусов папилломы, выявленных у пациента, наблюдалась достоверная корреляция, хотя и с невысокой степенью сопряженности ($r = -0,267$ при $p < 0,05$) [17].

Возрастные изменения показателей стандартной спермограммы были опубликованы ещё в 1950-53 гг., когда Дж. МакЛеод и Р.Голд опубликовали серию из 7 работ, посвященных разным показателям спермограммы здоровых мужчин и мужчин с бесплодием. Возрастной аспект был проанализирован авторами в 7-й статье [86]. В своей работе они доказали двукратное снижение интенсивности половой жизни у фертильных мужчин после 30 лет, снижение объема эякулята, абсолютного и относительного (в 1 мл) количества сперматозоидов, а также их подвижности. У мужчин с бесплодием указанные изменения носили более выраженный характер.

В последующие годы уровень и точность исследований существенно возросли, хотя методические различия требуют определенных уточнений при сопоставлении результатов 1970-80-х гг. с современными данными [104,111]. Результаты исследований фертильных мужчин 21-50 лет указывают, что минимальный объем эякулята наблюдался до 25 лет (около 3,4 мл) и после 46 лет (примерно 3,2 мл). Концентрация сперматозоидов была минимальной до 25 лет (около 97×10^6 в 1 мл), возрастала до $100-106 \times 10^6$ после 26 лет жизни и сохранялась на этом уровне до 46-50 лет. При этом у мужчин после 40 лет отмечалось некоторое снижение подвижности сперматозоидов и доли клеток

с нормальной морфологией [104]. В те же годы был проведен анализ материала после биопсии яичка у мужчин 21-50 и 51-80 лет [76]. Морфологические результаты возрастное угасание функций семенников, которое выражалось в уменьшении массы органа, объема и площади семенных канатиков, сокращении площади интерстициальной ткани при одновременной замене железистой ткани на волокнистую соединительную ткань.

Исследования последних лет, проведенные с использованием рекомендованных ВОЗ протоколов, расширили возрастной интервал обследуемого контингента и позволили составить более точную картину возрастных изменений. На основании 25-летних исследований когорты мужчин (1023 человека) с 5-летними интервалами прослежена возрастная динамика показателей у одних и тех же лиц [65]. Установлено, что объем эякулята начинает снижаться после 46 лет (что подтверждает данные [104]), однако только после 55 лет снижается в 2 раза от показателей тех же мужчин до 30 лет. Концентрация сперматозоидов в эякуляте остается стабильной в возрастном интервале 30-50 лет, но снижается на 20-25 % (до 42×10^6) после 55 лет при большом разбросе данных. Здесь обращает на себя внимание существенное понижение концентрации сперматозоидов в эякуляте к 2008 г. по сравнению с концом 70-х – началом 80-х годов, на что указывают многие авторы [4,34]. Подвижность сперматозоидов начинает снижаться после 46 лет, и этот процесс плавно идет на протяжении наблюдений до 55 лет и старше. Наконец, доля морфологически нормальных форм оказалась весьма стабильным индивидуальным показателем, который незначительно снизился (от 6,0 до 5,0% морфологически нормальных форм) за 25 лет наблюдений [65].

1.3.2. Вероятные причины возрастных изменений сперматозоидов

Список причин, который традиционно рассматривается в качестве причины возрастных изменения сперматозоидов, мало отличаются от

причин, ведущих к мужскому бесплодию. Чаще других причин указывают на длительное воздействие АФК, ведущее к повреждению ДНК и формированию многочисленных мутаций в половых и соматических клетках, старение хромосом, связанное с укорочением теломерных участков [84,121], хронические (главным образом, вирусные) инфекции [17], возрастное снижение продукции тестостерона [72,103], нарушения обмена веществ, связанные, как правило, с диабетом и ожирением [13,14], а также многочисленные сопутствующие патологии, из которых чаще других упоминаются заболевания сердечно-сосудистой системы [43,124].

Однако некоторые упомянутые в литературе возможные причины возрастных изменений морфологии и функциональных свойств сперматозоидов требуют дополнительного анализа. Клеточное старение может проявляться на нескольких уровнях. В стареющих клетках постепенно накапливаются побочные продукты, в результате чего уровень активности всех физиологических систем постепенно снижается. Именно это имел в виду В.М. Дильман, выдвигая аккумуляционную составляющую процесса старения [14]. Изменения митохондрий являются одними из наиболее примечательных особенностей стареющих клеток, и несколько теорий помещают митохондрии в центр клеточных событий, связанных со старением, а именно с точки зрения накопления окислительного повреждения клеток и тканей, процесса, в котором эти органеллы могут играть важную роль, хотя появились и альтернативные теории [44]. Эти гипотезы помещают митохондрии в центр физиологических событий, связанных со старением, а именно в отношении накопления окислительного повреждения клеток и тканей, процесса, в котором эти органеллы играют важную роль. Однако окислительный стресс - не единственный процесс, связанный со старением митохондрий; митохондриальный энергетический метаболизм, изменения митохондриальной ДНК или митохондриально-зависимая продукция тестостерона также важны. Важно отметить, что все эти проблемы, вероятно, взаимосвязаны. Авторы предполагают, что именно

в митохондриях всех клеток, в том числе и сперматозоидов, происходит накопление многих токсических факторов, и этот процесс с возрастом приводит к существенному снижению энергетической функции этих органоидов. При этом важно учитывать, что митохондриальный энергетический метаболизм также имеет решающее значение для мужской репродуктивной функции, поэтому митохондрии могут представлять собой общую связь между старением и потерей фертильности [45].

Совершенно иной подход связывает возрастное снижение качества сперматозоидов с истощением клеток сперматогенного эпителия, на который также распространяется действие всех указанных выше повреждающих факторов [62]. Эта гипотеза приводит к совершенно новому способу лечения мужского бесплодия, связанного с трансдифференцировкой соматических клеток пациента в человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Исходно этот метод был разработан для получения мезенхимальных стволовых клеток, способных обеспечить обновление клеток фибробластического ряда. Однако необходимо принимать во внимание, что зачатки будущих половых клеток очень рано обособляются от других магистральных направлений специализации эмбриональных тканей. Решение предложенной задачи равносильно дедифференцировке соматических клеток до стадий первичной экто- и энтодермы. Поэтому, несмотря на большой объем исследований в данной области, поставленные задачи пока весьма далеки от решения.

Возможно, что в решении проблемы старения мужской половой системы и гамет более успешными будут исследования эффектов антимюллеровского фактора (гормона, АМГ) – гликопротеина, принадлежащего к семейству трансформирующего ростового фактора- β (TGF- β). АМГ играет фундаментальную роль в регрессе мюллеровых протоков у мужского эмбриона. При его отсутствии мюллеровы протоки развиваются во внутренние женские репродуктивные органы. У мальчиков он в значительной степени продуцируется в клетках Сертоли семенников до

полового созревания, а затем медленно снижается до остаточных значений на протяжении всей остальной жизни мужчин. Так, максимальная продукция АМГ у мальчиков наблюдается в 1-4 года и составляет до 500 пМ/л. К началу периода полового созревания его уровень снижается до 150 пМ/л, а у взрослого мужчины репродуктивного возраста его уровень не превышает 30 пМ/л. АМГ служит биохимическим маркером наличия семенников у пациентов с крипторхизмом. Важно, что клетки Сертоли продуцируют АМГ в течение всей жизни не только в кровь, но и в семенную плазму [110]. Предполагается, что АМГ может удлинять срок активности герминативного эпителия семенных канатиков, что приводит к возможной кооперации этого метода и метода обновления герминативного эпителия за счет индуцибельных стволовых клеток человека [123].

Все изложенные в этом разделе возрастные изменения сперматозоидов неминуемо сказываются на их оплодотворяющей способности [89]. Однако изменения образа жизни современного человека, увеличение доли городского населения, удлинение периода профессионального роста и всё более поздние сроки семейного строительства и первых родов приводят к необходимости создания, использования и совершенствования методов сохранения и продления мужской фертильности.

1.4. Экстракорпоральное оплодотворение: краткий анализ теории и практики метода лечения мужского бесплодия

История метода экстракорпорального оплодотворения (ЭКО, *in vitro fertilization*, IVF) млекопитающих начинается в середине 1930-х гг. в США, после пионерских работ Г.Пинкуса на кроликах [100]. Первое сообщение об экстракорпоральном оплодотворении у человека датируется 1944 г., когда удалось довести оплодотворенный *in vitro* ооцит до стадии 4 бластомеров [102]. Значительный прогресс был связан с открытием в 1951 феномена капацитации как одного из главных условий оплодотворения [47,55]. Только в 1968 г. на мышинной модели удалось провести успешное оплодотворение *in*

vitro, после начала дробления на стадии двух бластомеров перенести зиготу в дроблении мыши-реципиенту и получить через 17,5 дней разнополюые эмбрионы, генетически отличающиеся от мыши-реципиента [114]. В Советском Союзе первые исследования по проблеме экстракорпорального оплодотворения были проведены в Крымском медицинском институте в Симферополе в 1955-59 гг. и связаны с именем Г.Н.Петрова [28]. Примечательно, что в этих работах сразу разрабатывались методы работы с клетками человека, а не мыши. Г.Н. Петров выяснил, что сперматозоид вне естественной среды не может проникнуть в яйцеклетку, то есть если бы эти работы получили дальнейшее развитие, то феномен капациации был бы открыт на 10 лет раньше. Но приоритетные исследования не были востребованы в своё время, а признание несомненных заслуг пришло к автору только в наши дни [1].

Результаты фундаментальных исследований конца 1960-х – начала 1970-х гг. и последующие усовершенствования методики получения ооцитов привели к рождению 25 июля 1977 г. в Великобритании первого ЭКО-ребенка, которым стала Луиза Браун. Это достижение было основано на многолетних исследованиях физиолога Р.Эдвардса (Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 2010 г.), врача-гинеколога П.Стрептоу и лаборанта Дж. Парди [61]. В СССР этот результат был повторен в 1986 г. почти одновременно сначала в Центре охраны здоровья матери и ребёнка (ныне Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова) под руководством проф. Б.В. Леонова, а затем в Ленинграде в Институте акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта под руководством проф. А.И. Никитина [1].

В 1991 г. технология ЭКО была дополнена методом интрацитоплазматического введения сперматозоида (*IntraCytoplasmic Sperm Injection*, ICSI). Разработанная в Центре репродуктивной медицины Брюссельского свободного университета, эта методика применяется в

случаях олигозооспермии, астенозооспермии, тератозооспермии, при наличии в семенной плазме антиспермальных антител, а также при недиагностируемых патологиях гамет обоих полов, тяжелых формах бесплодия и большом возрасте родителей, препятствующем оплодотворению с использованием классической процедуры ЭКО [78,112].

Уже в ходе первых этапов научных исследований, а затем и в процессе их практического применения возник вопрос о необходимости хранения материала для ЭКО. Необходимость долгосрочного хранения гамет и эмбрионов была связана с высоким риском неудач (особенно на первых этапах практического применения метода), этическими моментами, а также рисками полной потери фертильности одним из супругов, либо наличием угрозы их жизни. Криоконсервация широко используется в методе ICSI, а также хранения донорских сперматозоидов, когда замораживание материала позволяет наладить обмен донорскими гаметами между центрами ЭКО, расположенными в разных регионах, что позволяет решить ряд этических проблем и снизить риск близкородственных скрещиваний между потомками. Однако особую значимость проблема криоконсервации гамет и эмбрионов приобрела в животноводстве, где в настоящее время свыше 80% поголовья свиней и не менее 50% поголовья крупного рогатого скота производится методами искусственного осеменения или экстракорпорального оплодотворения [68,91].

Первые протоколы криоконсервации сперматозоидов появились ещё на этапах разработки самой процедуры ЭКО. В общих чертах, применение наборов для консервации гамет (как мужских, так и женских) направлено на минимизацию повреждения внешних и внутренних мембран клеток в ходе процедуры замораживания-оттаивания, что должно повысить их жизнеспособность. Многочисленные фирмы-производители такой реагентике стараются не раскрывать состав наборов, хотя можно предполагать, что все наборы составлены на основе забуференного 0,14 М раствора NaCl, обогащенного глюкозой и различными совместимыми с водой

неполярными растворителями, ускоряющими замораживание и уменьшающими формирование микрокристаллов льда.

Даже первые оценки подвижности сперматозоидов после замораживания-оттаивания, в проведенные на ранних этапах развития технологии ЭКО, показали заметное (на 30-60%) снижение процента подвижных форм после оттаивания [104]. Несмотря на большой объем исследований и разработок в этой области, распространение технологии на сельскохозяйственных и домашних животных, проблему существенного снижения подвижности и общей жизнеспособности сперматозоидов при хранении материала решить не удалось [60]. Неясными остаются как характер повреждений сперматозоидов (мембрана и распознающий аппарат, акросома, энергетический аппарат, ядро и хроматин), так и способы уменьшения объёма повреждений.

1.5. Изменения состава семенной плазмы при мужском бесплодии

Семенная плазма (СП) – сложная многокомпонентная система, включающая в себя множество ферментов, ростовых факторов, цитокинов, имеющих прямое отношение как к реализации оплодотворяющей функции сперматозоидов, так и к течению системных или локальных патологических процессов. Для успешного оплодотворения семенная жидкость, в которой находятся мужские гаметы, должна выполнять несколько важных, биологических функций. Во-первых, в ее составе должны содержаться факторы, обеспечивающие возможность прохождения сперматозоидов через слизистые барьеры женского репродуктивного тракта (шейки матки, маточных труб) и экстрацеллюлярного матрикса, окружающего яйцеклетку (cumulus oophorus, zona pellucida). Данная функция реализуется с участием различных протеолитических ферментов, которые формируют в семенной плазме сложную регуляторную систему, контролирующую процесс разжижения эякулята, прохождения сперматозоидов через слизистые барьеры и эффективность пенетрации внешних оболочек ооцита.

Основными особенностями метаболического профиля микроокружения сперматозоидов при мужском бесплодии являются снижение концентрации общего белка на фоне увеличения уровня мочевины и креатинина как отражение катаболической перестройки метаболизма, энергетический дефицит, проявляющийся в убыли глюкозы, пирувата, цитрата, АТФ и гиперовосстановленном состоянии никотинамидных нуклеотидов, избыток гомоцистеина, лактата и свободного холестерина, грубые изменения активности большинства изученных ферментов и медиаторных систем передачи внутри- и межклеточной информации, дисбаланс адипокинов и компонентов цитокиновой сети, недостаточность молекулярных факторов фертильности – гликоделина, ингибина, мелатонина, грелина и др. [27].

1.5.1. Компоненты комплемента семенной плазмы

Компоненты комплемента (С') и их рецепторы, играющие ключевую роль в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета, принимают участие в адгезии сперматозоида к яйцеклетке и их слиянии. Интерес к иммунологическим аспектам репродукции возник достаточно давно. Еще в 1978 г. Oliphant и его коллеги обнаружили присутствие компонентов комплемента в бычьей фолликулярной жидкости и их потенциальную роль в репродуктивном процессе [52]. Антитела к бычьему С3 ингибировали способность фолликулярной жидкости вызывать акросомальную реакцию сперматозоида, а альтернативный путь активации С' был вовлечен в процесс капацитации сперматозоида. Также показано, что С1q связывается с эякулированными сперматозоидами кролика, указывая на присутствие связанных иммуноглобулинов. В присутствии сыворотки, содержащей активные компоненты С', адгезия С1q вела к активации С', необратимому повреждению сперматозоида и нарушения акросомальной реакции. Не исключено, что факторы семенной плазмы защищают сперматозоид и в мужском, и в проксимальных отделах женского репродуктивного тракта от С'-зависимых повреждений [108].

Предполагается, что регулирующие C' белки также могут быть вовлечены во взаимодействие сперматозоида с ооцитом. Эта гипотеза была выдвинута в значительной степени на основе наблюдения, что рецепторы для компонентов комплемента расположены на внутренней акросомальной мембране и поэтому скрыты в головке сперматозоида. Роль этих регуляторов неясна, поскольку их местоположение не является соответствующим для защиты плазматической мембраны от атаки компонентов комплемента, и они только экспрессируются при встрече сперматозоида с яйцеклеткой и во время акросомальной реакции. В этом контексте большое внимание было уделено мембранному кофакторному белку (CD46). Молекула CD46 была идентифицирована на основании ее высокой экспрессии в репродуктивной системе и на трофобласте, где она явно играет роль ингибирования C', а также на акросоме сперматозоида [46,79]. Сперматозоиды человека после акросомальной реакции экспрессируют CD46, который связывает димерный C3b, продукт протеолиза C3 протеазами акросомы сперматозоида человека. Моноклональные антитела, специфические для рецептора комплемента первого (CD35) и третьего (CD11b/CD18) типа, связываются с плазмалеммой яйцеклетки, оставляя место для предположения, что специфические C'-связывающие молекулы могут играть роль в прикреплении катаболитов C3 к ооциту.

1.5.2. Факторы роста, цитокины, интерлейкины

Показано, что в семенной жидкости человека содержатся различные цитокины и их растворимые рецепторы. При этом уровень отдельных цитокинов в семенной жидкости значительно превышает аналогичные сывороточные концентрации, что указывает на потенциальную роль цитокинов в регуляции мужской фертильности. Основными продуцентами цитокинов, содержащихся в эякуляте, являются тестикулярные клетки Лейдига и Сертоли, преитубулярные и эпителиальные клетки придатков яичка, добавочных половых желез (семенных пузырьков, желез Купера,

предстательной железы), а также иммунокомпетентные клетки (лимфоциты, моноциты/макрофаги, NK-клетки), широко представленные во всех отделах мужского репродуктивного тракта. Показано, что мужские половые клетки различной степени зрелости, включая сперматозоиды, содержащиеся в эякуляте, экспрессируют на своей поверхности функциональные рецепторы к TGF- β / α , гепацитарному ростовому фактору (HGF), инсулиноподобному ростовому фактору (IGF-1R), гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору (GM-CSF), интерлейкину – 2 (IL – 2R α - и β -цепи), хемокинам (RANTES, фракталкин) и т.д.

Эти данные свидетельствуют о важной роли цитокинов в репродуктивной физиологии человека. Тем не менее, клиническая значимость измерения спермальных цитокинов в лабораторной диагностике мужского бесплодия, оценке фертилизационного потенциала сперматозоидов, отборе пациентов для дифференцированного лечения бесплодия с помощью ЭКО или с привлечением ICSI, прогнозе эффективности вспомогательных репродуктивных технологий остается дискуссионной. Считается, что анализ цитокинов не дает какой-либо информации при обследовании инфертильных мужчин, поскольку изменение уровня цитокинов в семенной плазме ассоциируется не с эффективностью сперматогенеза, а с уровнем воспаления в мужском репродуктивном тракте. При этом есть свидетельства наличия тесной корреляционной взаимосвязи между уровнями некоторых цитокинов с числом, подвижностью и/или морфологией сперматозоидов.

Существующие в литературе противоречия, по-видимому, объясняются несколькими причинами. Во-первых, отдельные неудачные попытки обнаружить значимые различия уровней цитокинов в зависимости от качества спермы обусловлены тем, что, как правило, анализируются наиболее простые и рутинные показатели спермограммы (число, подвижность, морфология сперматозоидов). К сожалению, за рамками таких исследований нередко остаются более сложные, но и более информативные

тесты, связанные с оценкой уровня апоптоза сперматозоидов или их функциональной активности – способности к развитию акросомальной реакции, эффективности связывания и/или пенетрации ооцитов, фертилизационного потенциала. Во-вторых, это ограниченное число исследуемых медиаторов. Как правило, в СП измеряется уровень отдельных цитокинов (от 1 до 2-3, очень редко больше), что не позволяет адекватно оценить роль многокомпонентной цитокиновой сети в регуляции мужской репродуктивной функции.

В-третьих, факторы семенной жидкости должны обеспечивать хемотаксис сперматозоидов по женскому репродуктивному тракту в зону фертилизации, который регулируется хемокинами (RANTES, фракталкин и др.), которые содержатся как в СП, так и в фолликулярной жидкости, попадающей в ампулярную часть маточных труб во время овуляции. Поскольку показано, что зрелые сперматозоиды экспрессируют соответствующие рецепторы, есть все основание полагать, что именно от уровня хемокинов, а также некоторых других цитокинов (TGF- α , фактора активации тромбоцитов - PAF) зависят их подвижность, транспорт и последующий контакт с яйцеклеткой.

В-четвертых, факторы семенной жидкости должны обеспечивать выживаемость сперматозоидов во «враждебной» среде женского репродуктивного тракта, а также индуцировать и поддерживать толерантность женской иммунной системы к спермальными аллоантигенам. Важно отметить, что СП фертильных мужчин характеризуется более выраженным ингибиторным действием, чем плазма инфертильных мужчин. Иммуносупрессорные свойства семенной жидкости связывают с полиаминами, простасомами, простагландинами, растворимыми FAS-молекулами, росттрансформирующими факторами, IL-10, рецепторным антогонистом IL-1 и т.д., которые секретируются семенными пузырьками и предстательной железой и содержатся в сперме в достаточно высоких концентрациях.

IL-6 также относится к провоспалительным цитокинам в связи со способностью индуцировать секрецию белков острой фазы гепатоцитами. бластоцисты. IL-6 оказывает влияние на число сперматогониев, дифференцировку зародышевых клеток и клеток Сертоли [73]. IL-8 также принимает участие в процессах оплодотворения и имплантации эмбриона.

Что касается хемокина RANTES, то его молекулы экспрессируются сперматозоидами человека при нахождении его и в мужском, и в женском репродуктивном тракте вплоть до момента оплодотворения. RANTES всегда присутствует в семенной плазме [93]. Уровень этого хемокина увеличен в семенной жидкости при инфекциях мужской мочеполовой системы. В капиллярном тесте RANTES оказывал дозозависимое воздействие на хемотаксис сперматозоидов человека. Возможно, высокие концентрации RANTES в жидкостях репродуктивного тракта, наблюдаемые при некоторых заболеваниях, связанных с бесплодием (эндометриоз, различные ЗППП) нарушают хемотаксис сперматозоидов к участку оплодотворения [74].

* * *

В известном смысле ситуацию в современной сперматологии можно охарактеризовать как методологический тупик, когда классические жестко регламентированные подходы, основанные на микроскопии и рутинных биохимических анализах, практически себя исчерпали и подвергаются обоснованной критике, а инновационные разработки на базе геномики и протеомики еще очень далеки от совершенства [27,49]. Тривиальный анализ спермы, который более 50 лет представлял собой краеугольный камень верификации оплодотворяющей способности, теряет былое значение, поскольку он дает минимум информации при многих формах мужского бесплодия.

Одной из причин замедления темпов прогресса в области диагностики бесплодия является то, что понимание базисных механизмов

жизнедеятельности зрелых сперматозоидов все еще ограничено. Главным образом это касается молекулярных основ фертильности, расшифровки всей совокупности взаимодействий между химическими соединениями, которые вовлечены в реализацию функции воспроизводства. Практика ЭКО, которая по сути является локомотивом исследований физиологии и патофизиологии сперматозоидов, добавляет новые проблемы, связанные с поиском новых методов оценки жизнеспособности и оплодотворяющей способности сперматозоидов у лиц разных возрастов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. 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 уреаплазмы, 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 объём эякулята (менее 2 мл).

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

2.2. 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 [119].

2.3. Анализ спермограммы

Анализ спермограммы и морфологии проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ [119]. Основные параметры спермограммы и референсные значения приведены в табл. 1.

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.

Для оценки морфологии сперматозоидов нативный эякулят разбавляли ЗФР в пропорции 1:1 и центрифугировали при 200g в течение 15 мин. Осадок переносили на предметное стекло, где фиксировали и окрашивали при помощи набора Reastain Quick-Diff Kit (Reagent, Финляндия) для дифференциального окрашивания клеточных элементов в мазках крови. Подсчет процента нормальных и атипичных форм проводили методом

световой микроскопии при объективе 100x под масляной иммерсией, определяя процент клеток с нормальной морфологией и долю округлых клеток.

Таблица 1

Перечень определявшихся параметров спермограммы

Показатель	Единицы измерения	Референсные значения по [119]
Объем материала	мл	более 1,5
Концентрация сперматозоидов	млн/мл	более 15
Агглютинировавшие клетки	%%	0
Прогрессивно-подвижные сперматозоиды, тип PR	%%	более 32
Клетки с нормальной морфологией	%%	более 4
Округлые клетки	млн/мл	менее 5

Долю агглютинировавших клеток оценивали во влажном препарате с использованием микроскопа Leica с бинокулярной насадкой при объективе 40x согласно рекомендациям [119].

Процент прогрессивно-подвижных форм типа PR оценивали в счетной камере Маклера для спермы на микроскопе (Leica) с бинокулярной насадкой при объективе 40x.

2.4. 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.

2.5. Криоконсервация сперматозоидов

Для криоконсервации сперматозоидов использовали четыре различных протокола с использованием четырех коммерческих наборов для

криоконсервации, которую осуществляли при полном соблюдении рекомендаций производителей.

2.5.1. Криоконсервация с использованием среды Квина, усовершенствованной для заморозки спермы (Sage, США). Перед замораживанием нативный материал не подвергали дополнительной предобработке с использованием отмывок или иного способа разбавления, но замораживали после инкубации в течение 30-60 мин при комнатной температуре для разжижения материала. После разжижения к эякуляту капельно в течение 30 сек добавляли среду для заморозки в соотношении 1:1 при постоянном перемешивании после внесения каждой капли для обеспечения полноценной эквilibрации сперматозоидов в среде для криоконсервации. После добавления всего необходимого объёма консервирующей среды для заморозки спермы смесь дополнительно выдерживали в 3 мин. Уравновешенный консервирующей средой материал перемещали в криовиалы, которые помещали в резервуар с водой комнатной температуры, и виалы в резервуаре ставили в холодильник на 4°C на 30-90 мин. По завершении этого этапа криовиалы переносили в верхнюю часть сосуда Дьюара, где их оставляли на 30-45 мин подвешенными на расстоянии 10-20 см над поверхностью жидкого азота, а затем быстро переносились в криохранилище.

После периода хранения криовиалы размораживали на водяной бане при температуре 35°C. Размороженную суспензию сперматозоидов переносили в пластиковую пробирку подходящего объёма и капельно в течение 30 сек добавляли десятикратный избыток среды для промывания спермы при постоянном тщательном перемешивании образца. Клетки затем тщательно отмывали и концентрировали путем центрифугирования.

2.5.2. Криоконсервация с использованием набора *Sperm Freezing Medium* (MediCult, Дания)

Аналогично п.2.5.1. сперму консервировали после разжижения, но без дополнительного разбавления. Набор *Sperm Freezing Medium* предварительно

выдерживали при комнатной температуре в течении 2 ч. Затем образцы разбавляли консервирующей средой в соотношении 1:1, добавляя среду капельно при тщательном перемешивании. После 10-минутного выдерживания при комнатной температуре образцы запечатывали в криовialsы, помещали над поверхностью жидкого азота на 30 мин, а затем погружали в него, где и хранили до использования.

В ходе размораживания материал переносили в пробирки, отогревали на водяной бане при 37°C и тщательно отмывали путем центрифугирования.

2.5.3. Криоконсервация с использованием набора *Freezing Medium* (Irvine Scientific, США)

Методы криоконсервации и размораживания с использованием этого набора полностью совпадает с описанием, изложенным в п. 2.5.1.

2.5.4. Криоконсервация с использованием раствора *Spermfreeze Solution* (Vitrolife, Швеция)

Методы криоконсервации и размораживания с использованием этого раствора полностью совпадает с описанием, изложенным в п. 2.5.2.

2.6. Лектин

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

2.7. Подготовка образцов для оценки жизнеспособности сперматозоидов методом проточной цитометрии.

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 blastocysts 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 (производства MediCult, Дания), для аликвоты 3 – среду Квина, усовершенствованную для заморозки спермы (Sage, США), для аликвоты 4 – набор Freezing Medium (Irvine Scientific, США), для аликвоты 5 – раствор Spermfreeze Solution (Vitrolife, Швеция). 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.

2.7.1. Пробоподготовка для проточной цитометрии и проведение анализа

Для всех образцов, находившихся в средах 1-5, параллельно использовали четыре метода оценки жизнеспособности сперматозоидов.

2.7.1.1. Использование DiOC₆(3) для оценки мембранного потенциала митохондрий

Для оценки мембранного потенциала митохондрий сперматозоидов как самого раннего маркера апоптоза использовали йодид 3,3'-дигексилотетракарбоцианина (DiOC₆(3), Invitrogen, США). Катионные липофильные красители, к группе которых относится DiOC₆(3) в литературе получили название «митохондриальных зондов», так как применяются для изучения мембранного потенциала митохондрий [57]. Благодаря своим липофильным свойствам DiOC₆(3) способен свободно проникать через билипидные мембраны клетки (поверхностную мембрану клетки, а также внешнюю и внутреннюю мембраны митохондрий) и, благодаря уже катионным свойствам, этот краситель накапливается в областях с высокой концентрацией протонов, то есть под внутренней мембраной митохондрий. Этот эффект сопровождается изменением интенсивности флюоресценции проникшего в клетки красителя в зеленой части спектра, что и регистрируют при анализе на проточном цитофлуориметре [118]. В том случае, если концентрация протонов снижена, как это имеет место на начальных этапах апоптоза, краситель будет накапливаться в них менее эффективно, и, как следствие, интенсивность его флюоресценции будет снижена. За счет этого можно отличить живые клетки с эффективно функционирующими митохондриями (и, как следствие, высокой интенсивностью флюоресценции), от гибнущих или мертвых клеток, в которых функционирование митохондрий нарушено. В том случае, если деполяризация митохондрий рассматривается как «раннее» событие при запуске апоптоза, то нарушение целостности поверхностной мембраны (то есть ее фрагментация) обычно характерно для клеток, находящихся на терминальных стадиях гибели. Поэтому для выявления разных стадий апоптоза, помимо DiOC₆(3), клетки дополнительно окрашиваются йодистым пропидием (PI) – красителем, способным взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами клеток. PI не способен диффундировать через билипидные

мембраны и, как следствие, не способен связаться с ДНК клеток. Однако по мере фрагментации цитоплазматической и ядерной мембран краситель проникает в клетку и взаимодействует РНК и ДНК. Следствием подобного взаимодействия является накопления красителя в цитоплазме и ядре, и клетка обретает флуоресценцию в красной части спектра.

Таким образом, живые жизнеспособные клетки будут обладать яркой флуоресценцией по каналу, предназначенному для детекции DiOC₆(3), но не будут накапливать йодистый пропидий (фенотип DiOC₆(3)^{brightPI}⁻). Клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза (митохондриальный потенциал снижен, но плазматическая мембрана еще сохраняет свою целостность и непроницаемость для йодистого пропидия), будут иметь фенотип DiOC₆(3)^{dim-to-negPI}⁻. Вместе с тем, клетки, находящиеся на поздней стадии апоптоза или уже погибшие (некроз), не будут эффективно накапливать DiOC₆(3), но будут окрашиваться PI – фенотип DiOC₆(3)^{dim-to-negPI}⁺.

Для оценки мембранного потенциала митохондрий к 100 мкл клеточной суспензии ($2-3 \times 10^6$ клеток/мл) добавляли 20-кратный рабочий раствор DiOC₆(3) («Invitrogen», США), получая конечную концентрацию красителя равную 20 нМ [53]. Рабочий раствор готовили *ex tempore*, добавляя к 10 мкл стокового раствора (стоковый – 1 мг красителя, растворенный в 1 мл ДМСО, аликвотировали по 10 мкл и хранили при -20°C до использования) 4900 мкл ЗФР. После внесения красителя образцы тщательно перемешивали и инкубировали в течение 20 мин при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в защищенном от света месте. По завершении инкубации образцы отмывали избытком ЗФР, содержащим 2% FCS (8 мин при 300g). После этого надосадок декантировали, а клеточный осадок переводили в 100 мкл свежего ЗФР. В полученную клеточную суспензию вносили 10 мкл раствора йодистого пропидия («Sigma-Aldrich», США), получая финальную концентрацию PI, равную 1 мкг/мл. Образцы инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. По

завершении инкубации в образцы вносили по 200 мкл ЗФР и проводили цитометрический учет.

2.7.1.2. Использование SYTO16 green для оценки целостности мембраны и плотности упаковки его ядерного хроматина

Отличительной чертой красителей семейства SYTO является их способность спонтанно проникать через клеточные билипидные мембраны и связываться с нуклеиновыми кислотами (ДНК и РНК) в цитоплазме, ядре и митохондриях клетки. Такого рода взаимодействие сопровождается многократным (по некоторым оценкам, до 40 раз) увеличением флуоресценции, тогда как в растворе – в отсутствие связывания с лигандами – флуоресценция данных красителей крайне низка. Подобно большинству флуоресцентных красителей цианиновой группы, молекулы SYTO несут несколько участков, которые могут связываться с фосфатными группировками в составе нуклеиновых кислот, а также интеркалировать между нуклеотидами и встраиваться между бороздками двуцепочечной ДНК. Существенным преимуществом данных красителей является отсутствие выраженного токсического эффекта, что было доказано в экспериментах по длительной инкубации (до 72 ч) клеток с данными красителями [117]. В настоящее время точные механизмы взаимодействия красителей SYTO с нуклеиновыми кислотами детально не изучены [115]. Но уже первый опыт применения SYTO в проточной цитометрии показал, что эффективность взаимодействия красителя с клетками, находящимися на разных стадиях апоптоза, заметно снижается при сравнении с окраской нормальных живых клеток. Поэтому живые клетки обычно характеризуются ярким свечением по SYTO (SYTO^{bright}), тогда как гибнущие клетки будут SYTO^{dim}. Поэтому большая часть гипотез касается именно данного аспекта применения красителей SYTO. Так, считается, что этот эффект может быть вызван взаимным «гашением» молекул SYTO, связанных с ДНК, в результате их пространственного сближения в ходе конденсации хроматина ядра клетки, что имеет место при апоптозе. Вместе с тем, снижение флуоресценции SYTO

в погибающих клетках также может быть вызвано резким уменьшением количества сайтов связывания красителя при конденсации хроматина, равно как и падением концентрации РНК в цитоплазме клетки в результате нарушения процессов транскрипции в ядре. Кроме того, при апоптозе нарушается нормальная работа митохондрий, в которых запускаются процессы деградации митохондриальной ДНК, что также сопровождается снижением числа сайтов связывания красителя и сопровождается общим снижением флуоресценции клетки. Нарушение мембранного потенциала митохондрий также может снижать эффективность накопления красителя клеткой. В последнем случае это объясняется наличием в составе всех представителей данной группы красителей положительно-заряженных группировок, определяющих общий положительный заряд молекул при нейтральных рН. Подобное наблюдение, по мнению Wlodkowic и соавторов [116], позволяет проводить аналогии между механизмом действия липофильных катионных митохондриальных «зондов» (например, JC-1 и TMRM) и красителей SYTO. Подобные феномены были описаны при комбинированной окраски клеток SYTO16 и TMRM, когда апоптотизирующие клетки слабо окрашивались обоими красителями, а живые клетки обладали выраженной флуоресценцией по каналам, предназначенным для детекции этих красителей.

Окраску клеток проводили в пробирках для проведения цитометрического учета 12x75 мм («Beckman Coulter», США). Для этого к 100 мкл клеточной суспензии ($2-3 \times 10^6$ кл/мл) добавляли по 5 мкл 20-кратного рабочего раствора SYTO-16 green («Invitrogen», США), получая конечную концентрацию красителя равную 125 нМ. Рабочий раствор готовили *ex tempore*, добавляя к 5 мкл стокового раствора 1995 мкл ЗФР (стоковый – 1 мМ ДМСО, аликвотировали по 5 мкл и хранили при -20°C до использования). После чего в образцы вносили по 10 мкл раствора йодистого пропидия («Sigma-Aldrich», США), получая финальную концентрацию PI равную 1 мкг/мл. Окраску проводили при комнатной температуре в течение

15 мин в защищенном от света месте. По завершении инкубации к образцам добавляли по 200 мкл ЗФР и анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ («Beckman Coulter», США). Для каждого из образцов анализировали не менее 50000 одиночных клеток.

2.7.1.3. Использование Родамин-123 для оценки состояния акросомального аппарата и митохондрий

Родамин 123 (Rh123) был самым первым флуоресцентным красителем, примененным для окрашивания митохондрий и оценки жизнеспособности клеток [77]. Благодаря своим липофильным свойствам Rh123 спонтанно диффундирует через плазматическую мембрану клетки, а наличие катионных свойств помогает ему преимущественно накапливаться в эффективно функционирующих митохондриях клетки, несущих отрицательный заряд на своей внутренней мембране. Вместе с тем, данный краситель может спонтанно окрашивать компоненты эндоплазматической сети и аппарата Гольджи, однако снизить неспецифическое окрашивание позволяет отмывка избытком физиологического раствора по завершении инкубации красителя с клетками. Это связано с тем, что в клетках с нарушенным мембранным потенциалом митохондрий краситель способен с одинаковой скоростью как проникать через мембрану внутрь, так и выходить наружу. Для эффективного возбуждения Rh123 используют источники света с длиной волны около 500 нм, тогда как максимум испускания данного красителя находится в районе 529 нм [57]. Обычно Rh123 применяется в концентрациях не более 0,5 мкМ или 0,1 мкг/мл, так как увеличение концентрации сопровождается усилением неспецифического окрашивания. Для приготовления маточных (стоковых) растворов используют ДМСО, после чего аликвотируют и хранят при -20°C до использования. Рабочие растворы готовят на среде, аналогичной той, которую применяют для культивирования клеток. Для исследования апоптоза применяют комбинированную окраску родамином 123, обладающим выраженной флуоресценцией в зеленой части спектра, и йодистым пропидием, максимум эмиссии которого приходится на красную

часть спектра. Подобный подход позволяет выделить живые клетки функционирующими митохондриями по свечению Rh123 и целостной поверхностной мембраной, непроницаемой для PI. Клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза, будут негативны по обоим красителям (мембранный потенциал митохондрий нарушен, но поверхностная мембрана еще сохраняет свою целостность), а при позднем апоптозе и некрозе клетки будут окрашиваться только йодистым пропидием.

В рамках проведения собственных экспериментов к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 20-кратный раствор Rh123, приготовленный *ex tempore*, получая конечную концентрацию красителя 100 мкг/мл. Образцы инкубировали 20 мин при 37°C в защищенном от света месте, после чего однократно отмывали избытком ЗФР, содержащим 2% FCS (330g в течении 8 мин при 15°C). Полученный клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл свежего ЗФР, после чего вносили йодистый пропидий в финальной концентрации 1 мкг/мл. По завершении 5-ти минутной инкубации в каждую пробу добавляли по 250 мкл ЗФР, и образцы анализировали на проточном цитометре Navios™.

2.7.1.4. Использование нового способа определения жизнеспособности сперматозоидов с использованием меченного FITC лектина нарцисса (патент Российской Федерации № 2689791, 2019 г.).

Для оценки уровня апоптоза 100 мкл суспензии клеток, полученной способом, описанным в п.2.7, переносили в пробирки для цитофлуориметрического учета. Далее в образцы добавляли по 10 мкл раствора NPA, специфически распознающего терминальные остатки α -D-маннозы, конъюгированного с FITC, в финальной концентрации 5 мкг/мл. После внесения реагентов клетки инкубировали 20 мин при 37°C в защищенном от света месте. По завершении инкубации для удаления из суспензии избытка красителя и подавления неспецифического связывания клетки отмывали избытком ЗФР с добавлением 2% FCS путем центрифугирования при 330g в течение 8 мин при охлаждении до 15°C.

Полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл ЗФР и к суспензии добавляли 10 мкл раствора йодистого пропидия (PI, финальная концентрация 1 мкг/мл) для выявления клеток, утративших целостность поверхностной мембраны. Пробы инкубировали в течение 5 мин в защищенном от света месте при комнатной температуре, после чего в каждую пробу добавляли по 250 мкл ЗФР, и образцы анализировали на проточном цитометре Navios™ способом, аналогичным для липофильных красителей.

2.7.2. Обработка результатов цитометрического анализа

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).

2.8. Оценка уровней IL-1 β , IL-6, IL-8, C3 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 надосадок замораживали в стерильных криовиалах (Nunc, США) в жидком азоте до тестирования на уровни цитокинов. Осадок сперматозоидов разбавляли в 2 раза средой IVF Medium (MediCult, США) и центрифугировали в течение 20 мин при 200g. Надосадочную жидкость удаляли, осадок пипетировали, на него наслаивали 1 мл той же среды, и образцы помещали в CO₂-инкубатор на 1 ч для флотации при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. После этого надосадочную жидкость снимали и центрифугировали при тех же условиях.

Полученный осадок разводили 50 мкл среды IVF Medium, и материал использовали для оплодотворения ооцитов в программе ЭКО. Через 24 ч оценивали процент оплодотворенных ооцитов.

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 IL-1 β , IL-6, IL-8, C3 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 C3 компонента комплемента – в нг/мл.

2.9. 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 [16,29,67,99]. 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 [23].

Исследуемые совокупности данных, измеренных в количественной шкале, оценивали на предмет их соответствия закону нормального распределения при помощи критерия Шапиро-Уилка. В случае подтвержденного нормального распределения совокупностей полученные данные объединяли в вариационные ряды, в которых проводили расчет средних арифметических величин (M), средних квадратических отклонений (σ) и средних ошибок средней арифметической (m) по стандартным

формулам. Для оценки статистической значимости различий использовали методы параметрического анализа.

В случае пропущенных значений – переменные исключались из соответствующего анализа.

При сравнении средних величин в нормально распределенных совокупностях t -критерий Стьюдента рассчитывали по следующей формуле (2.9.1.):

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}, \quad (2.9.1.)$$

где: M_1 и M_2 – сравниваемые средние величины, m_1 и m_2 – средние ошибки средних величин, соответственно.

Полученные значения t -критерия Стьюдента оценивали путем сравнения с критическими значениями, указанными в соответствующих справочных таблицах. Различия показателей считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

В качестве показателя тесноты корреляционной связи между нормально распределенными количественными показателями использовался линейный коэффициент корреляции r_{xy} Пирсона, который рассчитывали по следующей формуле:

$$r_{xy} = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \cdot \sum(y - \bar{y})^2}} \quad (2.9.2)$$

Значения коэффициента корреляции Пирсона интерпретировали в соответствии со шкалой Чеддока (табл.2).

Для оценки качества подбора линейной функции рассчитывали квадрат линейного коэффициента корреляции R^2 , называемый коэффициентом детерминации. Коэффициент детерминации показывает сколько процентов приходится на долю учтенных в модели факторов.

Оценка тесноты корреляционной связи по шкале Чеддока

Значения коэффициента корреляции Пирсона	Характеристика тесноты корреляционной связи
<0,1	связь отсутствует
0,1 – 0,3	слабая
0,3 – 0,5	умеренная
0,5 – 0,7	заметная
0,7 – 0,9	высокая
0,9 – 0,99	весьма высокая

Оценка статистической значимости коэффициента корреляции осуществлялась с помощью t -критерия Стьюдента, рассчитываемого по следующей формуле (2.9.3).

$$t_r = \frac{r_{xy}}{\sqrt{1 - r_{xy}^2}} \cdot \sqrt{n - 2} \quad (2.9.3)$$

Полученное значение t_r сравнивали с табличным значением при определенном уровне значимости и числе степеней свободы $n-2$. Если t_r превышал $t_{\text{табл}}$, то делался вывод о значимости корреляционной связи.

Для оценки зависимости одного количественного параметра от другого использовали метод линейной регрессии, который сводится к нахождению уравнения следующего вида (2.9.4):

$$y = a + bx, \quad (2.9.4)$$

где y – результативный количественный признак, x – значение фактора, a – константа, b – коэффициент регрессии, показывающий среднее изменение результата y с изменением фактора x на одну единицу.

Полученные регрессионные модели позволяют по заданным значениям фактора x находить теоретические значения результативного признака y .

В качестве показателя устойчивости результатов, выраженных количественными данными, полученных для сравниваемых объектов при

различных условиях, рассчитывали коэффициент конкордации W Кендалла по формуле (2.9.5).

$$W = \frac{12S}{m^2(n^3 - n)}, \quad (2.9.5)$$

где m – количество вариантов условий, n – число сравниваемых объектов, S – сумма квадратов разностей рангов.

Значения коэффициента конкордации Кендалла также интерпретировались в соответствии со шкалой Чеддока (табл. 3).

Статистическую значимость полученного коэффициента конкордации оценивали при помощи критерия χ^2 , рассчитываемого по формуле (2.9.6).

$$\chi^2 = m(n - 1) * W, \quad (2.9.6)$$

где m – количество вариантов условий, n – число сравниваемых объектов, W – рассчитанное значение коэффициента конкордации Кендалла.

В том случае, если полученное значение критерия χ^2 превышало критическое значение для соответствующего числа степеней свободы, делали вывод о наличии статистической значимости согласованности мнений экспертов.

Для сравнения вариационных рядов применялся однофакторный дисперсионный анализ, позволяющий ответить на вопрос, оказал ли фактор существенное влияние на разброс выборочных средних или разброс является следствием случайностей, вызванных небольшими объемами выборок. В качестве статистического критерия использовался критерий Фишера, рассчитываемый по формуле (2.9.7).

$$F = \frac{Q_1 / (m - 1)}{Q_2 / (n - m)} \quad (2.9.7)$$

где Q_1 – сумма квадратов отклонений выборочных средних от общего среднего, Q_2 – сумма квадратов отклонений наблюдаемых значений, n – число элементов, m – число выборок.

В том случае, если расчетное значение критерия Фишера F было меньше критического, определяемого по таблице, делали вывод об

отсутствии статистически значимого влияния изучаемого фактора на разброс средних значений признака. В противном случае признавалось существенное влияние независимого фактора на разброс средних значений при определенном уровне статистической значимости.

В случае обнаружения статистически значимых различий между группами дополнительно проводилось парное сравнение совокупностей при помощи апостериорного критерия Тьюки.

Для объединения пациентов по группам, исходя из их сходства по измеренным признакам, применяли двухэтапный кластерный анализ. Слияние объектов проводили путем межгруппового связывания, при котором объединялись группы, между которыми наблюдается наименьшее среднее расстояние. В качестве способа измерения расстояния между кластерами был выбран квадрат Евклидова расстояния, согласно которому расстояние между объектами равно сумме квадратов разностей между значениями одноименных переменных объектов. Для решения проблемы шкалирования переменных, включенных в кластерный анализ, все переменные приводились к стандартной z-шкале.

После формирования кластеров, для каждого из них с помощью методов описательной статистики рассчитывались средние показатели, соответствующие анализируемым признакам, которые затем сравнивались друг с другом.

Построение прогностической модели вероятности наступления беременности выполнялось при помощи метода бинарной логистической регрессии. Выбор метода обусловлен тем, что зависимая переменная является дихотомической, а независимые переменные характеризуют как качественные, так и количественные признаки, то есть могут измеряться по любой шкале. Прогностическая модель, построенная методом бинарной логистической регрессии, имела следующее математическое выражение (2.9.8):

$$p = 1 - \frac{1}{1 + e^{-z}},$$

$$z = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + \dots + a_nx_n, \quad (2.9.8)$$

где p – вероятность наступления беременности, подтвержденной результатами анализа на ХГЧ, $x_1 \dots x_n$ – значения факторов риска, измеренные в номинальной, порядковой или количественной шкале, $a_1 \dots a_n$ – коэффициенты.

Отбор независимых переменных производили методом пошаговой прямой селекции с использованием в качестве критерия исключения статистики Вальдовского. Статистическая значимость полученной модели определялась с помощью критерия χ^2 .

Мерой определенности, указывающей на ту часть дисперсии, которая может быть объяснена с помощью логистической регрессии, в данном исследовании служил показатель Найджелкерка.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Параметры спермограммы у пациентов разных возрастных групп

Как указывалось, в Гл.2, все пациенты были разделены на 3 возрастные группы: 26-29 лет, 30-34 года и 35-47 лет. Основные полученные результаты приведены в табл.3.

Таблица 3.

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

Показатель и единицы его измерения	Референсные значения [119]	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*

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

Результаты оценки параметров спермограммы у лиц разного возраста приведены в табл. 3. Из приведенных данных видно, что все средние значения по возрастным группам находятся в пределах установленных референсных значений. Тем не менее, при сопоставлении с референсными

значениями показателей, определенными в соответствии с рекомендациями ВОЗ, объем эякулята (в норме – более 1,5 мл) во всех случаях соответствовал нормальным значениям, при этом концентрация спермиев менее 15 млн/мл отмечалась в 14,9% случаев пациентов старше 35 лет, доля прогрессивно-подвижных спермиев менее 32% у 21,3% исследуемых во всех группах, случаи содержания клеток с нормальной морфологией по Крюгеру менее 4% составляли 36,2% из общего числа исследуемых, 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.

Таблица 4.

Дополнительные показатели спермограммы пациентов разных возрастных групп, проходивших лечение по поводу бесплодия, %% по группе

Показатель	Норма (по [119])	Возрастные группы		
		26 – 29 лет (n = 12)	30– 34 года (n = 25)	35 – 47 лет (n = 17)
Наличие лейкоцитов в эякуляте	менее 1	7	9	20
Наличие агглютинировавших 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

Из приведенных в табл. 4 данных видно, что с возрастом неуклонно возрастает частота обнаружения лейкоцитов (главным образом, нейтрофилов) в эякуляте, что может быть связано с различными причинами и острыми и хроническими заболеваниями. Одновременно не наблюдается математической взаимосвязи между частотой выявления агглютинировавших

сперматозоидов и частотой случаев обнаружения на поверхности гамет антител классов IgG или IgA (согласно значениям критерия χ^2 для таблицы 3×2 в случаях как IgG, так и IgA $p < 0,05$). Достоверность различий в распределениях между наличием агглютинировавших клеток и выявлением IgG или IgA на поверхности гамет указывает, что агглютинация сперматозоидов обусловлена иными, отличными от иммуноглобулинов, факторами.

В табл. 5 приведены результаты микробиологического и вирусологического исследований для патогенов, которые не рассматривались в качестве критериев исключения пациентов.

Таблица 5.

Уровень носительства некоторых микроорганизмов у пациентов обследованных групп, %% по группе

Микроорганизм	Возрастные группы		
	26 – 29 лет	30 – 34 года	35 – 47 лет
Вирус герпеса	45	44	50
Цитомегаловирус	18	30	25
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0	7	0
<i>Ureaplasma spp.</i>	9	29	0
Кишечная микрофлора	7	10	8

Из приведенных данных видно, что уровень инфицирования вирусами герпеса (*Herpes simplex* и *Herpes zoster*) заметно превышает уровень инфицирования другими возбудителями, что полностью совпадает с данными обследования любых контингентов. Несколько ниже уровень инфицирования другим членом суперсемейства герпесвирусов - цитомегаловирусом. Низкие уровни выявления микоплазмы и уреаплазмы, по-видимому, являются следствием качественно проведенной подготовки к процедуре ЭКО, включавшей среди прочих мероприятий один или несколько курсов антибиотикотерапии.

В табл. 6 собраны данные об эффективности процедуры ЭКО по группам, а также о примененных вариантах экстракорпорального оплодотворения.

Таблица 6.

Усредненные результаты ЭКО у пациентов разных возрастных групп, проходивших лечение по поводу бесплодия, %%

Показатели	Возрастные группы		
	26 – 29 лет	30 – 34 года	более 35 лет
Стандартная процедура ЭКО	50	48	12
ЭКО в модификации ICSI	50	52	88
Наступление оплодотворения	88	79	61
Доля TQ-эмбрионов через 72 ч после ЭКО	60	44	44
Наступление беременности по биохимическому критерию	44	38	21
Клинически подтвержденное наступление беременности	44	38	21
Роды	44	38	21

Данные табл. 6 показывают, что после достижения пациентом возраста 34 лет собственная оплодотворяющая способность сперматозоидов заметно снижается и для достижения положительного результата процедуры требуется использование технологии ICSI. Оплодотворяющая способность сперматозоидов даже в условиях ЭКО снижается со скоростью 2% в год: от 88% в возрасте до 30 лет к 61% после 35 лет (табл.6). 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 существенному падению показателя (до 21% и ниже) после 35 лет.

3.2. Оценка жизнеспособности сперматозоидов человека методом проточной цитометрии

Для оценки жизнеспособности сперматозоидов использовали 3 химических зонда и меченый лектин нарцисса. Краситель DiOC₆(3) использовали 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. Возможность применения этих красителей сравнивали с возможностью использования меченого NPA.

3.2.1. Сопоставление способности химических зондов и NPA к окрашиванию апоптотических клеток

На рис. 1 приведены типичные результаты оценки доли живых клеток и клеток в раннем и позднем апоптозе, полученных от здоровых доноров, при окрашивании DiOC₆(3).

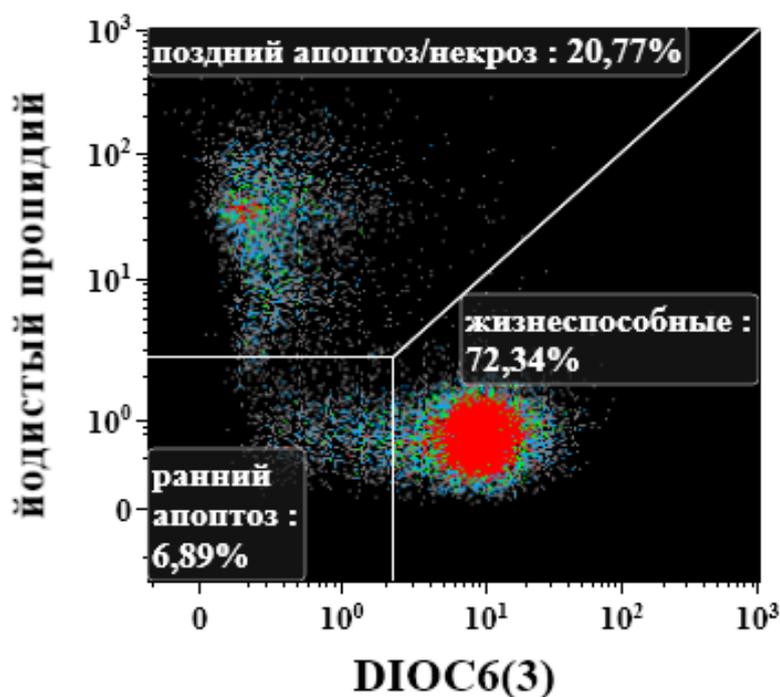


Рис. 1. Пример результата оценки жизнеспособности сперматозоидов методом проточной цитометрии при окрашивании DiOC₆(3) и PI.

По оси абсцисс: интенсивность свечения DiOC₆(3), усл. ед.; по оси ординат: интенсивность свечения PI, усл. ед. Другие обозначения в поле рисунка.

Из данных на рисунке видно, что 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. 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.

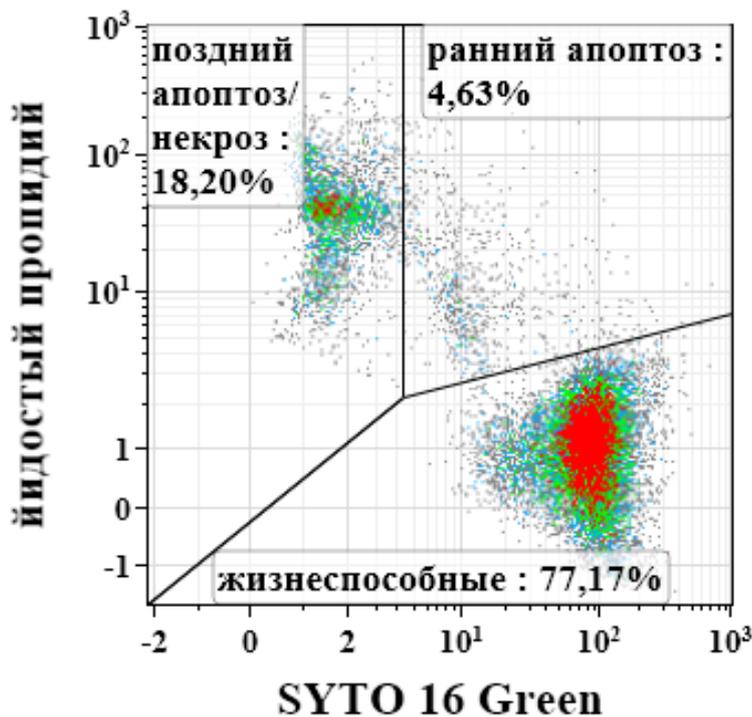


Рис. 2. Пример результата оценки жизнеспособности сперматозоидов методом проточной цитометрии при окрашивании SYTO-16 Green и PI.

По оси абсцисс: интенсивность свечения SYTO-16 Green, усл. ед.; по оси ординат: интенсивность свечения йодистого пропидия, усл. ед. Другие обозначения в поле рисунка.

На рис. 2 представлены результаты оценки жизнеспособности сперматозоидов с использованием красителя SYTO16 green. Результаты на рис. 2 указывают, что этот зонд позволяет оценить состояние 77,17% сперматозоидов как живых, 4,63% клеток – как клеток в раннем апоптозе и 18,20% - как клеток в позднем апоптозе.

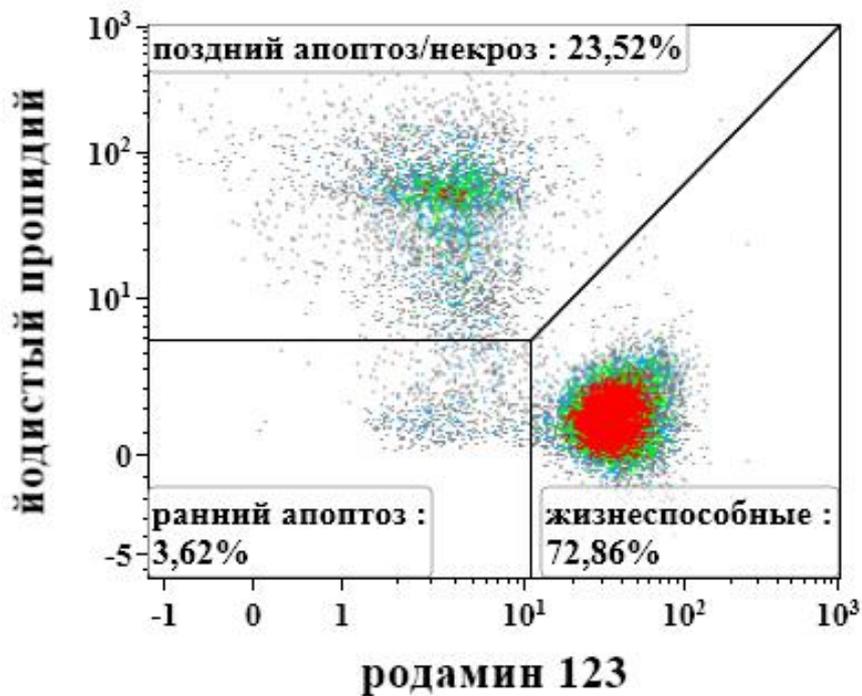


Рис. 3. Пример результата оценки жизнеспособности сперматозоидов методом проточной цитометрии при окрашивании Rh123 и PI.

По оси абсцисс: интенсивность свечения Rh123, усл. ед.; по оси ординат: интенсивность свечения йодистого пропидия, усл. ед. Другие обозначения в поле рисунка.

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.3).

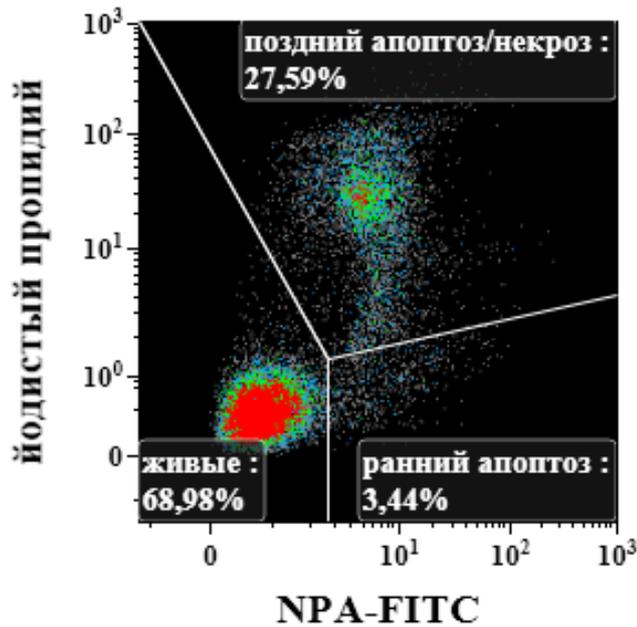


Рис. 4. Пример результата оценки жизнеспособности сперматозоидов методом проточной цитометрии при окрашивании NPA-FITC и PI.

По оси абсцисс: интенсивность свечения NPA-FITC, усл. ед.; по оси ординат: интенсивность свечения йодистого пропидия, усл. ед. Другие обозначения в поле рисунка.

На рис. 4 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, как показывают результаты на рис. 4, 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%.

Сопоставление результатов этой серии экспериментов приведено в табл. 7. Видно, что именно при окрашивании NPA выявляется минимальная доля живых клеток и максимальная доля клеток в позднем апоптозе, хотя в целом все использованные варианты цитометрического определения жизнеспособности сперматозоидов дают сопоставимые результаты.

Таблица 7

Сопоставление способности химических зондов и NPA к окрашиванию сперматозоидов различной жизнеспособности, %.

Краситель	Живые клетки	Ранний апоптоз	Поздний апоптоз
DiOC ₆ (3)	72,34	6,89	20,77
SYTO16 green	77,17	4,63	18,20
Родамин-123	72,86	3,62	23,52
NPA	68,98	3,44	27,59

3.2.2. Применение метода цитометрического учета для оценки жизнеспособности сперматозоидов после криоконсервации

Как описано в Главе 2, 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. 8.

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	$\underline{W'}$ $p_{w'}$
контроль	53,6 ± 2,1	54,4 ± 2,3	53,1 ± 2,4	51,5 ± 2,7	<u>0,234</u> < 0,001
2	22,5 ± 1,6	20,8 ± 1,7	19,9 ± 1,7	19,6 ± 1,7	<u>0,086</u> < 0,01
3	24,9 ± 1,7	24,5 ± 1,9	24,2 ± 1,9	23,4 ± 1,9	<u>0,072</u> < 0,01
4	15,0 ± 1,6	12,2 ± 1,4	11,6 ± 1,4	12,2 ± 1,4	<u>0,103</u> < 0,001
5	23,5 ± 1,6	21,9 ± 1,6	21,0 ± 1,7	21,4 ± 1,6	<u>0,075</u> < 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.

Приведенные в табл.8 результаты указывают, 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 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).

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.

Как указано в Главе 2, 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.9. 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.

Таблица 9

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		<i>p</i>
	$M \pm m$	$M \pm \sigma$	$M \pm m$	$M \pm \sigma$	
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 .

Результаты табл.9 показывают, что достоверное наступление беременности после ЭКО связано с относительно высокой (свыше 65% по всем методам оценки) жизнеспособностью сперматозоидов. При этом наивысший уровень жизнеспособности гамет (в среднем $70,0 \pm 2,4$ % при максимальном индивидуальном значении 80,4% живых клеток) проявляется при окрашивании лектином нарцисса. Этот показатель достоверно отличается

от уровней жизнеспособности клеток, выявленных другими красителями (согласно *t*-критерию Стьюдента). Это позволяет заключить, что лектин нарцисса выявляет не только жизнеспособность сперматозоидов, но и позволяет оценить их оплодотворяющую способность. Высокая эффективность оплодотворения также связана с выраженным окрашиванием красителем DiOC₆(3) ($66,3 \pm 3,1$ % живых клеток). При этом доля живых клеток, выявленная с помощью Rh123 и SYTO16, несколько ниже, хотя достоверно не отличается от показателей жизнеспособности сперматозоидов, выявленных DiOC₆(3) (табл.9).

Таблица 10

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

Уровень ХГЧ в сыворотке женщины	менее 25 мМЕ/мл		25 мМЕ/мл и более		<i>p</i>
	$M \pm m$	$M \pm \sigma$	$M \pm m$	$M \pm \sigma$	
Жизнеспособность					
Краситель					
DiOC ₆ (3)	$53,6 \pm 3,4$	46,3 - 61,0	$43,9 \pm 3,7$	35,7 - 52,1	> 0,05
SYTO16	$54,2 \pm 4,6$	44,2 - 64,3	$45,5 \pm 3,6$	37,7 - 53,3	> 0,05
Rh123	$51,8 \pm 4,5$	41,9 - 61,7	$43,0 \pm 4,3$	33,5 - 52,5	> 0,05
NPA	$50,4 \pm 5,0$	39,4 - 61,3	$41,0 \pm 5,4$	28,7 - 53,2	> 0,05

Примечание: см. табл.9.

При сывороточных уровнях ХГЧ ниже 25 мМЕ/мл в крови женщины после ЭКО носит вероятностный характер. Данные из табл. 9 также свидетельствуют, что в этих случаях показатели жизнеспособности сперматозоидов были заметно ниже, и ни один из методов оценки жизнеспособности сперматозоидов не обладал прогностическим значением в отношении их оплодотворяющей способности.

Результаты табл.9 подтверждаются данными, приведенными в табл.10, полученными в случаях применения технологии ICSI в ходе ЭКО.

Технология ICSI предусматривает введение сперматозоида непосредственно в цитоплазму ооцита путем микроинъекции. В этом случае состояние поверхностного аппарата сперматозоида, его митохондрии, а также акросомального комплекса теряет круциальное значение для процесса оплодотворения, что полностью подтверждается полученным результатами (табл.10).

Из табл. 10 видно, что при любом способе оценки жизнеспособности сперматозоида она ниже аналогичного показателя табл. 9. Более того, между показателями, полученными с применением разных красителей, нет достоверных различий ни в одном случае. Ещё одним заметным отличием результатов, полученных для случая применения технологии ICSI, является высокая вероятность наступления беременности (и сопутствующий ей высокий уровень ХГЧ в крови женщины) при более низкой (в среднем на 10%) жизнеспособности сперматозоидов.

3.3. 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. 11. 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.

Таблица 11

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
	живые клетки		
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*
	клетки в раннем апоптозе		
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
	клетки в позднем апоптозе		
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 $p < 0,05$.

Статистически достоверный характер эти различия между крайними возрастными группами принимают лишь при окрашивании лектином нарцисса NPA. Напротив, доля клеток в раннем и позднем апоптозе максимальна у лиц старше 35 лет, и различия с пациентами 26-29 лет принимают достоверный характер не только при окрашивании NPA, но и DIOC₆(3) (для раннего апоптоза) и Syto16 green (в случае позднего апоптоза). Показатели жизнеспособности сперматозоидов пациентов группы 30-34 лет всегда занимали промежуточное положение между данными для двух других групп, что подтверждается отсутствием достоверных различий между ними в случае как живых, так и апоптотических клеток.

Использование различных красителей для оценки жизнеспособности сперматозоидов позволяет получить дополнительные важные сведения о возрастных изменениях гамет. Связывание лектина нарцисса NPA отражает изменения плотности гликокаликса клеток. Одновременно уровень связывания NPA с живыми клетками может быть связан с состоянием распознающего аппарата сперматозоидов, что отражает работу клеток Сертоли и косвенно подтверждает приведенные в разделе 3.1. результаты (табл.3).

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 гаметы: окрашивание зондом DIOC₆(3) свидетельствует об ослаблении энергетической эффективности митохондрии примерно на 1% в год (табл. 11). 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.3), сопровождающееся понижением жизнеспособности

гамет (табл.11) 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.6). 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. 12-15 приведены результаты оценки жизнеспособности сперматозоидов лиц разных возрастов после криоконсервации в указанных выше специальных средах 2-5. Эти результаты дают существенную информацию о возрастных изменениях гамет, наиболее чувствительных к криоконсервации показателях их физиологии и пригодности различных сред к применению у лиц разных возрастов. Приведенные в этих табл. 12-15 и обобщенные в табл. 16 результаты доказывают, что в целом процедура криоконсервации сперматозоидов снижает жизнеспособность сперматозоидов в 2 и более раза по сравнению с нативными гаметами, данные для которых приведены в табл.11.

Приведенные в табл. 12 показывают, что доля живых (по результатам цитометрического исследования) сперматозоидов после криоконсервации в среде 2 Sperm Freezing Medium снижается в 2,3 – 2,8 раза по результатам оценки жизнеспособности с использованием разных красителей у лиц в возрасте 26-29 лет, в 2,4 – 2,6 раза у лиц в возрасте 30-35 лет и в 2,7-3,7 раза у лиц старше 35 лет. Следует отметить, что доля клеток в раннем апоптозе остается почти неизменной по сравнению с нативными гаметами, а изменением показателей жизнеспособности выражается в снижении доли живых клеток и удвоении доли сперматозоидов в позднем апоптозе. Криоконсервация в среде 2 Sperm Freezing Medium особенно существенно сказывается на показателях, связанных с целостностью мембран у лиц старше 35 лет: выявляемом при помощи NPA состоянии гликокаликса

(снижение жизнеспособности в 2,8 раза) и состоянии акросомального комплекса, сохранность которого оценивается по окрашиванию Родамином 123 (снижение жизнеспособности в 3,7 раза) (табл. 12 и табл. 11).

Таблица 12

Оценка жизнеспособности сперматозоидов после криоконсервации в среде 2 (Sperm Freezing Medium) у пациентов различных возрастных групп методом проточной цитометрии, %, $M \pm m$

Краситель	Возрастные группы		
	26 – 29 лет	30 – 34 года	более 35 лет
	живые клетки		
DIOC ₆ (3)	24,8 ± 4,1	23,2 ± 3,1	18,4 ± 3,2
Syto16 green	21,7 ± 3,9	21,2 ± 4,0	18,0 ± 3,4
Родамин 123	22,2 ± 4,8	19,6 ± 3,5	13,3 ± 3,4
NPA	21,1 ± 4,0	19,5 ± 3,7	16,9 ± 3,4
	клетки в раннем апоптозе		
DIOC ₆ (3)	4,3 ± 0,7	4,1 ± 1,1	8,0 ± 2,5
Syto16 green	3,2 ± 0,5	3,3 ± 0,5	2,8 ± 0,5
Родамин 123	7,6 ± 3,9	7,5 ± 2,4	9,7 ± 2,6
NPA	7,5 ± 3,8	7,3 ± 2,2	10,2 ± 2,8
	клетки в позднем апоптозе		
DIOC ₆ (3)	71,0 ± 4,2	72,7 ± 3,0	73,6 ± 3,0
Syto16 green	74,9 ± 4,1	75,7 ± 3,8	79,1 ± 3,7
Родамин 123	70,2 ± 4,4	72,9 ± 3,0	73,5 ± 2,8
NPA	71,3 ± 4,1	72,9 ± 3,2	72,9 ± 3,4

Приведенные в табл. 13 результаты характеризуют сохранность гамет при криоконсервации в среде 3 (среда Квина, усовершенствованная для заморозки спермы). Как и в случае использования среды Sperm Freezing Medium, доля клеток в раннем апоптозе после криоконсервации не

изменяется по сравнению с нативными клетками. Однако уровень снижения жизнеспособности гамет у лиц разных возрастов оказывается иным.

Таблица 13

Оценка жизнеспособности сперматозоидов после криоконсервации в среде 3 (среда Квина, усовершенствованная для заморозки спермы) у пациентов различных возрастных групп методом проточной цитометрии, %%, $M \pm m$

Краситель	Возрастные группы		
	26 – 29 лет	30 – 34 года	более 35 лет
	живые клетки		
DIOC ₆ (3)	27,7 ± 3,7	25,2 ± 3,5	20,0 ± 4,1
Syto16 green	25,9 ± 4,0	24,9 ± 3,9	20,0 ± 4,5
Родамин 123	28,9 ± 4,5	24,1 ± 3,7	18,9 ± 4,5
NPA	24,9 ± 4,3	23,7 ± 3,8	19,2 ± 4,5
	клетки в раннем апоптозе		
DIOC ₆ (3)	4,6 ± 0,5	6,4 ± 2,1	8,2 ± 2,4
Syto16 green	3,4 ± 0,5	3,7 ± 0,5	3,0 ± 0,5
Родамин 123	3,3 ± 0,6	8,0 ± 2,8	9,2 ± 2,6
NPA	7,7 ± 3,7	8,3 ± 2,8	33,4 ± 27,5
	клетки в позднем апоптозе		
DIOC ₆ (3)	67,6 ± 3,9	68,4 ± 3,0	71,9 ± 4,2
Syto16 green	70,6 ± 4,3	71,4 ± 4,0	76,9 ± 4,8
Родамин 123	67,8 ± 4,3	67,9 ± 3,0	72,0 ± 3,9
NPA	67,4 ± 4,1	68,0 ± 3,2	70,8 ± 4,4

Так, для лиц 26-29 лет отмечено снижение жизнеспособности в 2,0 – 2,3 раза, для лиц 30-34 лет – в 2,2 – 2,3 раза, для лиц старше 35 лет – в 2,5 – 2,6 раза по результатам использования всех красителей. Существенно, что применение среды Квина примерно одинаково сказывается на всех оцениваемых показателях жизнеспособности и не связано с избирательным повреждением каких-либо структур.

Оценка жизнеспособности сперматозоидов после криоконсервации в среде 4 (набор Freezing Medium) у пациентов различных возрастных групп методом проточной цитометрии, %, $M \pm m$

Краситель	Возрастные группы		
	26 – 29 лет	30 – 34 года	более 35 лет
	живые клетки		
DIOC ₆ (3)	18,9 ± 4,5	13,8 ± 2,8	11,9 ± 3,8
Syto16 green	14,7 ± 3,6	12,5 ± 2,8	7,4 ± 1,6
Родамин 123	15,0 ± 3,9	11,4 ± 2,6	7,0 ± 1,5
NPA	15,1 ± 3,9	12,1 ± 2,6	8,1 ± 1,7
	клетки в раннем апоптозе		
DIOC ₆ (3)	3,7 ± 0,6	5,6 ± 1,8	7,2 ± 1,9
Syto16 green	2,5 ± 0,8	2,4 ± 0,4	2,6 ± 0,4
Родамин 123	7,2 ± 4,4	8,1 ± 2,6	9,4 ± 2,4
NPA	7,8 ± 4,5	7,1 ± 2,1	9,4 ± 2,8
	клетки в позднем апоптозе		
DIOC ₆ (3)	77,3 ± 4,4	80,6 ± 2,8	83,8 ± 2,6
Syto16 green	82,7 ± 4,2	85,1 ± 3,1	90,0 ± 1,7
Родамин 123	77,8 ± 4,6	80,6 ± 2,9	83,7 ± 2,4
NPA	80,2 ± 3,5	80,7 ± 2,9	82,6 ± 2,9

Низкая жизнеспособность сперматозоидов установлена после криоконсервации в среде 4 (набор Freezing Medium) (табл. 14). При сравнении показателей с данными нативных клеток (табл. 11) установлено, что у пациентов 26-29 лет снижение жизнеспособности составило 3,1 – 3,9 раза, у лиц 30-34 лет – 3,9 – 4,7 раза, у лиц старше 35 лет – 4,1 – 7,0 раз. После использования среды 4 отмечены минимальные доли живых клеток (менее 10%) и максимальные доли клеток в позднем апоптозе (до 82-90 % от общего числа клеток, табл. 14).

Оценка жизнеспособности сперматозоидов после криоконсервации в среде 5 (раствор Spermfreeze Solution) у пациентов различных возрастных групп методом проточной цитометрии, %, $M \pm m$

Краситель	Возрастные группы		
	26 – 29 лет	30 – 34 года	более 35 лет
	живые клетки		
DIOC ₆ (3)	24,4 ± 3,6	23,2 ± 3,6	21,5 ± 3,5
Syto16 green	21,5 ± 3,4	22,2 ± 3,3	19,7 ± 3,7
Родамин 123	20,3 ± 3,6	21,8 ± 3,5	18,3 ± 4,3
NPA	21,5 ± 3,3	21,8 ± 3,4	19,4 ± 4,0
	клетки в раннем апоптозе		
DIOC ₆ (3)	3,9 ± 0,7	5,9 ± 2,2	7,2 ± 2,8
Syto16 green	2,7 ± 0,4	3,6 ± 0,7	2,9 ± 0,4
Родамин 123	7,8 ± 4,0	7,3 ± 2,4	10,4 ± 3,4
NPA	7,2 ± 3,6	7,2 ± 2,1	11,0 ± 3,1
	клетки в позднем апоптозе		
DIOC ₆ (3)	71,7 ± 3,5	70,9 ± 2,7	71,4 ± 2,9
Syto16 green	76,0 ± 3,6	75,7 ± 3,8	77,5 ± 3,9
Родамин 123	71,9 ± 3,7	70,8 ± 2,5	71,2 ± 3,0
NPA	71,3 ± 3,6	71,1 ± 2,6	64,9 ± 6,8

В табл. 15 приведены результаты оценки жизнеспособности сперматозоидов, подвергнутых криоконсервации в среде 5 (раствор Spermfreeze Solution). Криоконсервация в этом растворе обеспечила сравнительно высокие уровни выживания гамет у пациентов всех возрастных групп: для группы 26-29 лет диапазон снижения жизнеспособности составил 2,4-2,8 раза для всех зондов, для группы 30-34 года – 2,3-2,6 раза, для группы 35-47 лет снижение доли живых клеток после криоконсервации составило 2,3 – 2,7 раза, что явилось одним из лучших показателей для этой возрастной группы.

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: индекс снижения жизнеспособности равен отношению средних показателей жизнеспособности криоконсервированных сперматозоидов к показателю жизнеспособности сперматозоидов после криоконсервации; ♦ -

наименьшее снижение индекса жизнеспособности для данной методики оценки жизнеспособности; \oplus - наименьшее снижение индекса жизнеспособности по возрастной группе. .

В табл. 16 приведены результаты математической обработки результатов табл. 11 – 15 для живых клеток. Показатель рассчитывали как отношение соответствующего показателя из табл. 11, полученного для нативных сперматозоидов, к аналогичному показателю из табл. 12-15, полученного для сперматозоидов после криоконсервации. Из приведенного в табл. 16 анализа результатов 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. Между тем, для возрастной группы 35-47 лет наивысшая сохранность клеток в ходе криоконсервации чаще всего была связана с применением среды 5.

3.4. Влияние иммунохимических показателей семенной плазмы на способность сперматозоидов к оплодотворению

В рамках данного раздела работы использовали СП от пациентов, для которых удалось получить оплодотворение ооцитов в рамках процедуры ЭКО без применения технологии ICSI. 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.

Полученные результаты по всем показателям отличались большой вариативностью и дисперсией, что отражают приведенные в табл. 17

показатели. Средние значения приведены на рис. 5, а результаты статистического анализа обобщены в табл. 18.

Таблица 17

Примеры вариативности оцениваемых показателей у пациентов Групп 1 и 2, $M \pm m$.

Б	Группа 1					Б	Группа 2				
	IL-1 β	IL-6	IL-8	АМГ	С3		IL-1 β	IL-6	IL-8	АМГ	С3
A	180	321	266	785	5878	S	280	400	480	50	1911
B	156	275	460	3196	2533	T	242	330	50	130	160
C	178	123	210	1019	2505	U	68	48	32	0	61
D	108	97	226	772	1771	V	130	225	332	5954	2168
E	130	25	376	3947	20	W	356	204	1170	33	1014
F	130	568	214	729	4944	X	124	86	30	18	161
G	25	202	314	962	1687	Y	158	48	52	74	4303
H	221	178	280	197	2869	Z	144	150	266	696	7756
I	248	566	522	87	4523						
J	120	684	846	3092	4215						
K	256	190	210	120	2140						
L	286	167	284	203	4636						
M	146	397	528	15934	5951						
N	100	209	306	315	4411						
O	208	148	300	1886	3206						
P	184	90	156	610	2364						
Q	88	150	266	696	7756						
R	116	184	366	–	2336						

Примечание: Б – условные обозначения больных.

По результатам ИФА было установлено, что уровень IL-8 в Группе 1 варьировал в пределах от 156 до 1170 пг/мл (Табл. 17). При этом среднее

значение концентрации IL-8 по группе составило 361 пг/мл (Рис.5). Параллельно в Группе 2 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 IL-6 в Группе 1 варьировал в пределах от 50 до 684 пг/мл. При этом среднее значение концентрации IL-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 IL-1 β в Группе 1 варьировал в пределах от 50 до 286 пг/мл. При этом среднее значение концентрации IL – 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 в пределах от 0 до 5954 пг/мл при среднем значении 902 пг/мл (Рис. 5).

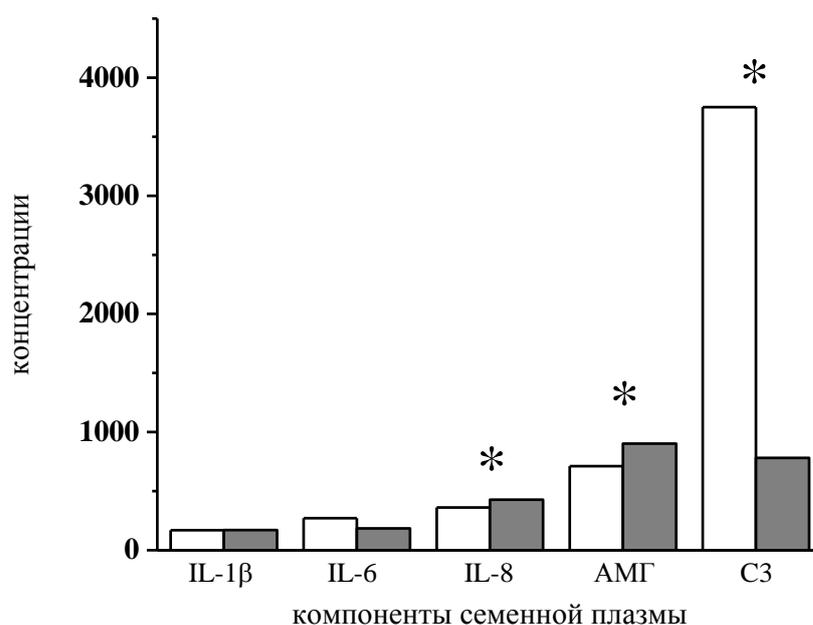


Рис. 5. Средние значения концентрации ряда компонентов семенной плазмы у пациентов исследуемых групп по результатам иммуноферментного анализа. По оси абсцисс: компоненты семенной плазмы; по оси ординат: концентрации, для всех – пг/мл, для С3 – нг/мл. Белые столбики – Группа 1, серые столбики – Группа 2. * - различия между группами достоверны по *W*-критерию Уайта при $p < 0,05$.

Таблица 18

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

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, IL-8 и С3 компонента комплемента в семенной плазме и не существует различий по распределению концентраций IL-1β и IL-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 СЗ. Напротив, в Группе 2 была выявлена достоверная обратная корреляционная зависимость процента оплодотворения от концентрации СЗ в семенной плазме (табл.18).

3.5. Статистический анализ результатов исследования

3.5.1. Спермограмма

С целью выявления связи между параметрами спермограммы нами был проведен двухэтапный кластерный анализ, в результате которого исследуемая совокупность была разделена на 2 кластера, характеризуемых значением средней силуэтной меры 0,5, что соответствует среднему качеству кластеров. Средние значения количественных показателей спермограммы, а также возраста пациентов в разрезе кластеров представлены в табл.19.

Таблица 19

Характеристика кластеров пациентов, определенных исходя из значений показателей спермограммы

Показатель спермограммы	Первый кластер		Второй кластер		<i>p</i>
	<i>M ± m</i>	95% ДИ	<i>M ± m</i>	95% ДИ	
Объем эякулята	3,6±0,3	3,0–4,2	3,5±0,3	2,9–4,1	0,82
Концентрация	35,0±3,0	28,9–41,1	97,9±8,5	79,6–116,3	<0,001*
Прогрессивно-подвижные формы	42,9±4,0	34,8–51,1	42,0±5,5	30,1–53,9	0,894
Норм. морфология	4,4±0,5	3,4–5,5	10,6±1,4	7,5–13,6	0,001*
Округлых клеток	1,6±0,4	0,8–2,5	3,8±1,7	0,2–7,5	0,223
Возраст пациентов	33,5±1,0	31,4–35,6	32,7±1,1	30,2–35,1	0,605
% оплодотворений	75,3±5,3	64,5–86,0	73,9±6,6	59,8–88,1	0,884

Примечание: ДИ – доверительный интервал, * - статистическая достоверность.

Исходя из наблюдаемых значений показателей спермограммы в полученных кластерах пациентов, первый кластер следует отнести к менее благоприятным, по сравнению вторым. Значения концентрации сперматозоидов и их доли с нормальной морфологией по Крюгеру были статистически значимо ниже в первом кластере ($p < 0,001$ и $p = 0,001$, соответственно). Остальные показатели, включая возраст пациентов, имели сопоставимые значения. Различия кластеров по частоте случаев цвета спермы, отличного от нормы, наблюдаемых у 13,8% пациентов первого кластера и 16,7% пациентов второго кластера, также были статистически не значимыми ($p = 1,0$, данные не приведены). Процент оплодотворения среди пациентов первого кластера составил $75,3 \pm 5,3\%$, среди пациентов второго кластера – $73,9 \pm 6,6\%$. В связи с тем, что различия между показателями оказались статистически не значимыми ($p = 0,884$), был сделан вывод об отсутствии существенной корреляционной связи между показателями спермограммы и процентом оплодотворений.

3.5.2. Сравнительный анализ методов оценки жизнеспособности сперматозоидов

В ходе этого этапа анализа проведено сопоставление результатов оценки жизнеспособности сперматозоидов при помощи проточной цитометрии в зависимости от используемых сред криоконсервации. При этом использовались различные методики окрашивания. Полученные средние значения доли жизнеспособных сперматозоидов при использовании различных сред для криоконсервации и красителей, уже представлены выше в табл.8.

Сопоставление результатов оценки содержания жизнеспособных сперматозоидов в нативном эякуляте и при криоконсервации в различных средах при помощи коэффициента конкордации W Кендалла указывает на наличие статистически значимой взаимосвязи между показателями, полученными с использованием различных красителей ($p < 0,05$ во всех случаях). При этом корреляционные связи отличались слабой теснотой,

максимальные значения W Кендалла отмечены для нативного материала, составляя 0,234.

При сопоставлении содержания жизнеспособных сперматозоидов в зависимости от используемой среды для криоконсервации получены значения коэффициента конкордации W Кендалла, свидетельствующие о наличии статистически значимых корреляционных связей высокой тесноты ($p < 0,001$ для всех красителей). Наибольшим значением W Кендалла характеризовалась корреляция показателей при использовании красителя NPA, составляя 0,79.

Также рассмотрены результаты однофакторного дисперсионного анализа содержания жизнеспособных сперматозоидов в зависимости от применяемой среды для криоконсервации. Показатели уровня значимости представлены в табл. 20.

Таблица 20

Сравнение содержания жизнеспособных сперматозоидов в зависимости от использования различных сред для криоконсервации

Сравниваемые комбинации сред	Уровень значимости при сопоставлении			
	DIOS	SYTO16	Rho123	NPA
Контроль (1) – (2)	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Контроль (1) – (3)	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Контроль (1) – (4)	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Контроль (1) – (5)	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
(2) – (3)	0,864	0,614	0,504	0,591
(2) – (4)	0,024*	0,009*	0,017*	0,041*
(2) – (5)	0,994	0,994	0,994	0,955
(3) – (4)	0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
(3) – (5)	0,980	0,854	0,769	0,945
(4) – (5)	0,006*	0,002*	0,005*	0,005*

Примечание: * - различия между парами сравниваемых сред статистически достоверны

Результаты проведенного однофакторного дисперсионного анализа практически не зависели от используемого красителя ($p > 0,05$ во всех случаях) и показали, что содержание жизнеспособных сперматозоидов статистически значимо различалось в зависимости от использования сред ($p < 0,001$ во всех случаях).

При парных сравнениях показателей с помощью апостериорного критерия Тьюки было установлено, что процент жизнеспособных сперматозоидов в нативном материале был статистически значимо выше по сравнению с любой из сред для криоконсервации ($p < 0,001$ во всех случаях). Среда 4 отличалась наименьшим содержанием жизнеспособных сперматозоидов при сравнении с остальными средами ($p < 0,05$ во всех случаях). Показатели, полученные для сред 2, 3 и 5 были статистически сопоставимыми ($p > 0,05$).

На основании отсутствия различий в содержании жизнеспособных сперматозоидов в зависимости от используемого красителя были рассчитаны средние значения содержания сперматозоидов, соответствующих определенным критериям жизнеспособности, для нативного материала и для каждой из сред криоконсервации. Полученное распределение представлено в табл.21.

Таблица 21

Среднее содержание сперматозоидов, соответствующих определенным критериям жизнеспособности, в различных средах

Среда	Жизнеспособность сперматозоидов		
	Живые	Ранний апоптоз	Поздний апоптоз
Контроль (1)	53,6±2,5	7,4±0,7	39,0±2,1
2	20,7±1,6	5,9±0,7	73,3±1,5
3	24,2±1,8	7,9±1,7	69,4±1,6
4	12,7±1,3	5,9±0,7	81,7±1,4
5	22,0±1,5	6,3±0,7	71,6±1,4

Полученные средние значения содержания сперматозоидов, соответствующих определенным критериям жизнеспособности, сопоставлены для различных сред на Рис. 6.

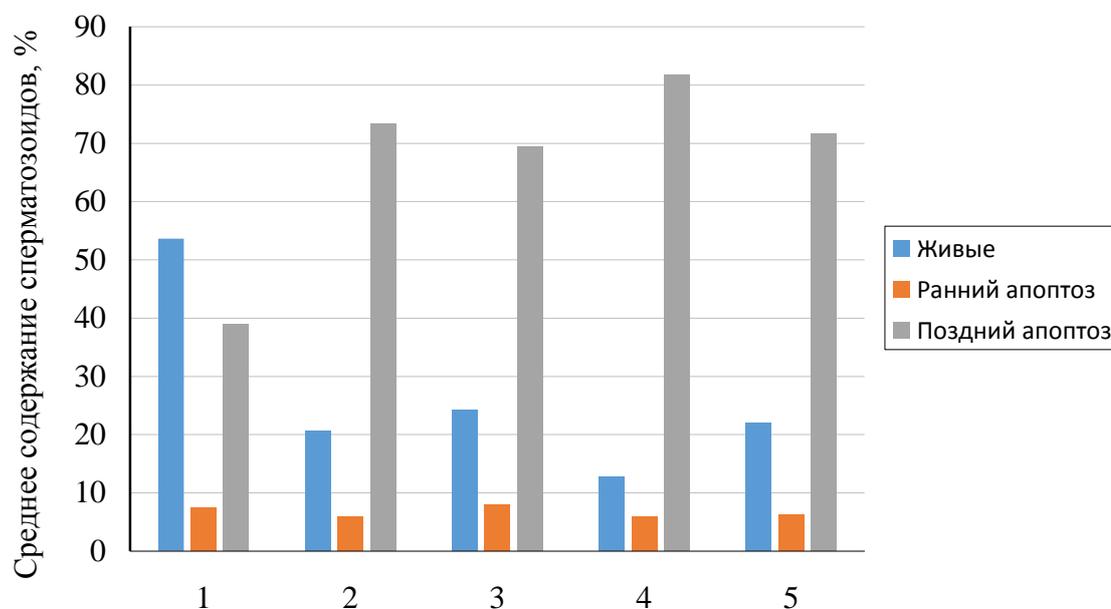


Рис. 6. Содержание сперматозоидов, соответствующих определенным критериям жизнеспособности, в нативном эякуляте и различных средах

По оси абсцисс: 1- контроль (нативный эякулят 2-5 - среды для криоконсервации; по оси ординат: средняя доля сперматозоидов разной жизнеспособности, %%

Из результатов проведенного анализа следует, что наименьшая доля сперматозоидов, находящихся в апоптозе, отмечается в нативном эякуляте (39,0%). Минимальным содержанием апоптотически измененных сперматозоидов отличалась среда 3 (69,4%). Наибольший процент сперматозоидов в апоптозе наблюдался для среды 4 (81,7%).

Среднее содержание жизнеспособных сперматозоидов в нативном эякуляте и в различных средах для криоконсервации было сопоставлено с

возрастом пациентов и показателями спермограммы. Найденные закономерности представлены в табл. 22.

Таблица 22

Результаты корреляционного анализа взаимосвязи среднего содержания жизнеспособных сперматозоидов в различных средах с возрастом и показателями спермограммы

Показатель	Значение коэффициента корреляции r_{xy} Пирсона; и его достоверность p				
	контроль	среда 2	среда 3	среда 4	среда 5
Возраст	-0,104; $p=0,598$	-0,3; $p=0,108$	-0,272; $p=0,139$	-0,316; $p=0,079$	-0,176; $p=0,344$
Объем эякулята	-0,192; $p=0,235$	-0,222; $p=0,157$	-0,187; $p=0,23$	-0,01; $p=0,951$	-0,214; $p=0,169$
Концентрация сперматозоидов	0,414; $p=0,007^*$	0,399; $p=0,008^*$	0,347; $p=0,021^*$	0,204; $p=0,178$	0,336; $p=0,026^*$
Доля прогрессивно- подвижных форм	0,234; $p=0,141$	0,296; $p=0,054$	0,289; $p=0,058$	0,195; $p=0,199$	0,289; $p=0,057$
Нормальная морфология	0,281; $p=0,075$	0,09; $p=0,568$	0,059; $p=0,704$	-0,089; $p=0,561$	0,117; $p=0,45$
Содержание округлых клеток	0,213; $p=0,212$	0,287; $p=0,081$	0,286; $p=0,077$	0,096; $p=0,56$	0,294; $p=0,07$

Примечание: * - статистическая достоверность коэффициента корреляции Пирсона.

Согласно полученным нами результатам, между содержанием жизнеспособных сперматозоидов в нативном эякуляте (контроль) и в средах для криоконсервации 2, 3, 5 и показателем концентрации сперматозоидов по данным спермограммы отмечались статистически значимые прямые корреляционные связи ($p=0,007$, $p=0,008$, $p=0,021$ и $p=0,026$, соответственно).

Зависимость процента жизнеспособных сперматозоидов в нативном эякуляте от концентрации сперматозоидов по данным спермограммы была дополнительно рассмотрена при помощи метода парной линейной регрессии. В результате было получено следующее уравнение (3.1).

$$Y_{СЖС} = 47,36 + 0,17X_{КС}, \quad (3.1)$$

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

Исходя из значения коэффициента регрессии, увеличение концентрации сперматозоидов на 1 млн/мл позволяет предположить рост содержания жизнеспособных сперматозоидов в нативном эякуляте на 0,17%. Наблюдаемая зависимость может быть представлена с помощью графика (Рис. 7).

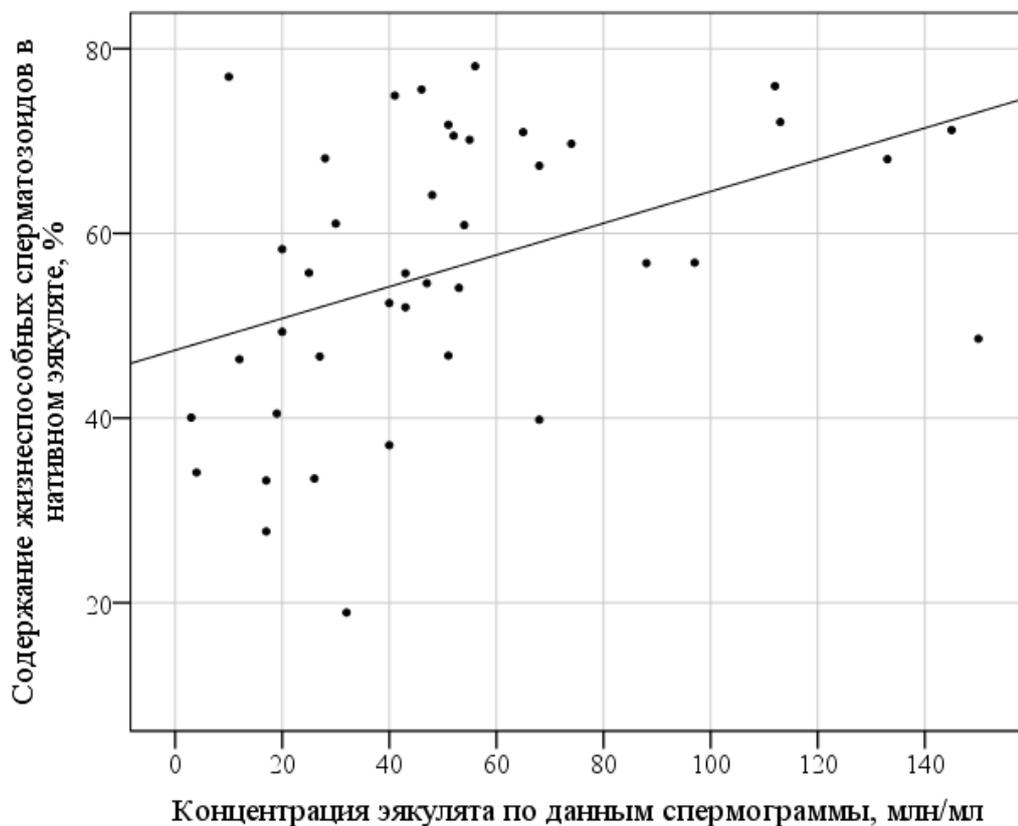


Рис. 7. Зависимость содержания жизнеспособных сперматозоидов в нативном эякуляте (%) от концентрации сперматозоидов (млн/мл)

Обозначения осей приведены в поле рисунка.

Коэффициент детерминации R^2 для уравнения линейной регрессии (3.1) составил 0,172, что свидетельствует о 17,2% дисперсии содержания жизнеспособных сперматозоидов в нативном эякуляте, объясняемой с помощью исследуемого фактора.

Для других показателей спермограммы не было получено статистически значимых корреляционных связей с процентом жизнеспособных сперматозоидов, однако можно отметить следующие тенденции, характеризуемые уровнем значимости близким к критическому.

Так, по всей вероятности, нельзя отрицать наличие взаимосвязи исследуемого параметра и возраста пациентов. Как для контрольного нативного эякулята, так и для различных сред для криоконсервации было установлено наличие обратных корреляций. Наибольшей теснотой, являющейся по шкале Чеддока умеренной, характеризовалась связь между возрастом и содержанием жизнеспособных сперматозоидов в среде 4 ($r_{xy} = -0,316$; $p=0,079$). Достаточно очевидной является прямая корреляционная связь между содержанием прогрессивно-подвижных сперматозоидов и содержанием жизнеспособных сперматозоидов. Для трех сред – 2, 3 и 5 она характеризовалась уровнем значимости, не превышающим 0,06 и значениями коэффициента корреляции r_{xy} Пирсона от 0,289 до 0,296. В тех же средах отмечались достаточно выраженные прямые корреляционные связи между содержанием жизнеспособных сперматозоидов и содержанием округлых клеток ($r_{xy} \sim 0,286-0,294$, $p \sim 0,07-0,081$). Наконец, процент спермиев с нормальной морфологией имел близкий к критическому уровень значимости прямой корреляционной связи с содержанием жизнеспособных сперматозоидов в нативном эякуляте ($r_{xy} = 0,281$; $p=0,075$).

3.5.3. Оценка результатов ЭКО в зависимости от показателей состояния эякулята

В качестве результатов ЭКО нами были рассмотрены следующие показатели: процент оплодотворений, процент эмбрионов TQ и наступление беременности по данным анализа крови на ХГЧ.

Вначале нами была оценена взаимосвязь между ними. Так, средние значения процента оплодотворений и доли эмбрионов TQ в зависимости от факта наступления беременности, подтверждённого результатами анализа крови на ХГЧ, сопоставлены в табл. 23.

Таблица 23

Средние показателей процента оплодотворений и доли эмбрионов TQ в зависимости от наступления беременности

Показатель	Факт наступления беременности				<i>p</i>
	Подтвержден		Не подтвержден		
	<i>M±m</i>	95% ДИ	<i>M±m</i>	95% ДИ	
Процент оплодотворений	76,2±5,9	63,7–88,8	73,0±5,6	61,2–84,8	0,712
Доля эмбрионов TQ	63,5±5,9	50,9–76,2	38,6±6,2	25,8–51,4	0,011*

Примечание: ДИ – доверительный интервал; * - различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$).

Проведенный при помощи *t*-критерия Стьюдента статистический анализ показал, что совокупность случаев ЭКО, завершившихся наступлением подтвержденной результатами анализа крови на ХГЧ беременности, отличалась значительно более высоким средним процентом эмбрионов TQ ($p=0,011$). Различия процента оплодотворений в сравниваемых группах оказались статистически не значимыми ($p=0,712$).

При сопоставлении значений процента оплодотворений с долей эмбрионов TQ при помощи параметрического корреляционного анализа, было установлено отсутствие статистически значимой взаимосвязи между данными параметрами ($r_{xy} = 0,234$; $p=0,102$).

Важным фактором, оказывающим непосредственное влияние на результаты ЭКО, является факт проведения процедуры ICSI. Оценка различий результатов ЭКО в зависимости от последнего представлена в табл.24.

Сравнение результатов ЭКО в зависимости от применения ICSI

Результат ЭКО	Использование ICSI		Без ICSI		<i>p</i>
	<i>M±m</i>	95% ДИ	<i>M±m</i>	95% ДИ	
Процент оплодотворений	81,2±3,7	73,7–88,7	67,4±7,3	52,4–82,5	0,099
Доля эмбрионов TQ, %	50,1±5,4	38,9–61,2	46,2±7,5	30,7–61,7	0,669

Примечание: см. табл. 23

Проведенный анализ показал, что в группе пациентов, которым была проведена процедура ICSI, процент оплодотворений был выше в среднем на 20,5% и составлял 81,2±3,7%. При отсутствии ICSI показатель был равен 67,4±7,3%. Различия не были статистически значимыми, однако прямая зависимость результатов ЭКО от проведения ICSI вполне вероятной. Также был сопоставлен процент состоявшихся беременностей, подтвержденных результатами анализа крови на ХГЧ, в зависимости от проведения ICSI. При использовании данной репродуктивной технологии процент беременностей составил 48,0%, в то время как в группе без использования ICSI показатель был более чем в 2 раза меньше и равен всего 23,8%. Различия данных показателей также не были статистически значимыми ($p=0,166$), однако можно предполагать наличие соответствующей тенденции.

Учитывая возможное влияние процедуры ICSI на результаты ЭКО зависимость процента оплодотворений, доли эмбрионов TQ и частоты подтвержденных беременностей от различных факторов была рассмотрена отдельно в двух группах в зависимости от применения ICSI. Результаты сравнения показателей для пациентов с подтвержденной и неподтвержденной беременностью, которым ICSI не проводилась, приведены в табл. 25.

Средние значения факторов в группах пациентов с подтвержденной и неподтвержденной анализом крови на уровень ХГЧ беременностью при отсутствии ICSI

Показатель спермограммы	ХГЧ <25 мМЕ/мл		ХГЧ ≥ 25 мМЕ/мл		<i>p</i>
	<i>M±m</i>	95% ДИ	<i>M±m</i>	95% ДИ	
Объем эякулята	3,6±0,3	2,6–4,3	3,7±0,4	2,3–5,1	0,829
Концентрация	49,8±6,7	35,4–64,1	88,0±6,1	43,3–132,7	0,019*
Процент прогрессивно-подвижных форм	50,4±4,9	39,8–60,9	44,2±5,3	15,6–72,7	0,561
Нормальная морфология	8,3±1,3	5,6–11,1	6,6±1,6	2,2–11,0	0,501
Доля округлых клеток	2,5±1,0	0,2–4,8	2,3±0,9	0,0–5,3	0,908

Примечание: см. табл. 23

В соответствии с полученными данными, среди пациентов, которым ICSI не проводилось, наступление беременности, подтвержденной анализом крови на уровень ХГЧ на 10-е сут после имплантации, характеризовалось существенно более высоким средним уровнем концентрации сперматозоидов в эякуляте, составляющим 88,0±6,1 млн/мл ($p=0,019$). Для других показателей статистически значимых закономерностей выявлено не было ($p>0,05$ во всех случаях).

При сопоставлении возраста пациентов, в группе с неподтвержденной беременностью среднее значение составило 34,5±1,0 года, а при наличии беременности – 31,8±2,6 года. Различия были не существенными ($p=0,253$).

Также была проведена оценка различий содержания жизнеспособных сперматозоидов при подтвержденной и неподтвержденной беременности при использовании различных красителей в качестве зондов для оценки жизнеспособности сперматозоидов. Полученные данные представлены в табл.26.

Таблица 26

Средние значения содержания жизнеспособных сперматозоидов в группах пациентов с беременностью, подтвержденной и неподтвержденной результатами анализа крови на ХГЧ, при отсутствии ICSI

Краситель	ХГЧ <25 мМЕ/мл		ХГЧ ≥ 25 мМЕ/мл		<i>p</i>
	<i>M±m</i>	95% ДИ	<i>M±m</i>	95% ДИ	
ДИОС ₆ (3)	62,3±2,8	56,3–68,3	66,3±3,1	57,6–75,0	0,472
SYTO16 green	64,7±2,7	59,0–70,4	65,0±4,9	51,4–78,6	0,958
Родамин 123	65,1±2,6	59,6–70,6	65,4±4,3	53,3–77,5	0,955
НРА	62,4±2,8	56,3–68,5	70,0±2,4	59,6–80,4	0,049*
Среднее значение	63,9±2,8	57,9–69,9	70,1±1,1	65,4–74,8	0,046*

Примечание: см. табл. 23

Различия содержания жизнеспособных сперматозоидов в эякуляте в зависимости от наступления беременности были статистически значимыми в случае окраски лектином НРА ($p=0,049$) и при сравнении средних показателей ($p=0,046$). В обоих случаях показатель был выше у пациентов с подтвержденной беременностью.

При проведении корреляционного анализа с целью выявления статистически значимых связей между процентом оплодотворений или долей эмбрионов ТQ и показателями спермограммы, а также содержанием жизнеспособных сперматозоидов в эякуляте, статистически значимых корреляций не было обнаружено ($r_{xy} < 0,3$; $p > 0,05$ во всех случаях).

Аналогичным образом было рассмотрено влияние различных факторов на результаты ЭКО в группе пациентов, которым было проведено ICSI. Средние значения показателей спермограммы в зависимости от наличия подтвержденной беременности представлены в табл. 27.

Средние значения факторов в группах пациентов с подтвержденной и неподтвержденной анализом крови на ХГЧ беременностью после проведения ICSI

Показатель спермограммы	ХГЧ <25 мМЕ/мл		ХГЧ ≥ 25 мМЕ/мл		<i>p</i>
	<i>M±m</i>	95% ДИ	<i>M±m</i>	95% ДИ	
Объем эякулята	3,9±0,7	2,3–5,6	3,2±0,3	2,5–3,8	0,297
Концентрация	59,2±3,1	30,0–88,3	36,7±7,9	19,2–54,3	0,157
Процент прогрессивно-подвижны форм	43,3±5,4	31,2–55,3	31,1±7,7	13,9–48,3	0,211
Нормальная морфология	4,0±1,0	1,8–6,2	4,9±1,4	1,7–8,1	0,608
Доля округлых клеток	2,4±0,9	0,4–4,4	2,1±1,4	0,0–5,2	0,844

Примечание: см. табл. 23

Как показал проведенный статистический анализ, различия показателей спермограммы в группе пациентов, которым было выполнено ICSI, в зависимости от наличия подтвержденной беременности были статистически не значимыми ($p > 0,05$ во всех случаях).

Таковыми же несущественными были различия возраста пациентов, ЭКО у которых завершилось подтвержденной анализом крови на ХГЧ беременностью ($32,3 \pm 1,1$ года) и тех, у кого беременность была не подтверждена ($32,8 \pm 1,7$ года). Уровень значимости соответствовал $p = 0,803$.

Результаты сравнения содержания жизнеспособных сперматозоидов в зависимости от наличия подтвержденной беременности при использовании различных красителей приведены в табл. 28.

Средние значения содержания жизнеспособных сперматозоидов в группах пациентов с беременностью, подтвержденной и неподтвержденной анализом крови на ХГЧ, при наличии ICSI

Краситель	ХГЧ <25 мМЕ/мл		ХГЧ ≥ 25 мМЕ/мл		<i>p</i>
	<i>M±m</i>	95% ДИ	<i>M±m</i>	95% ДИ	
ДИОС ₆ (3)	53,6±3,4	46,3–61,0	43,9±3,7	35,7–52,1	0,064
SYTO16 green	54,2±4,6	44,2–64,3	45,5±3,6	37,7–53,3	0,151
Родамин 123	51,8±4,5	41,9–61,7	43,0±4,3	33,5–52,5	0,172
НРА	50,4±5,0	39,4–61,3	41,0±5,4	28,7–53,2	0,217
Среднее значение	53,3±4,3	43,7–62,8	43,7±4,2	34,1–53,2	0,133

Примечание: см. табл. 23.

В случае сопоставления средних уровней содержания жизнеспособных сперматозоидов в эякуляте в зависимости от подтверждения беременности у пациентов, которым проводилась ICSI, также не было установлено статистически значимых различий ($p > 0,05$ во всех случаях).

Корреляционный анализ, направленный на выявление связей между процентом оплодотворений или долей эмбрионов TQ и показателями спермограммы или содержанием жизнеспособных сперматозоидов в эякуляте не обнаружил статистически значимых закономерностей ($r_{xy} < 0,3$; $p > 0,05$ во всех случаях).

Таким образом, установлено 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 зависели от наличия процедуры ICSI, так как наблюдались только при отсутствии данной репродуктивной технологии.

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 незначимых или коррелирующих между собой факторов, нами была получена следующая формула (1).

$$P = 1/(1 + e^{-z}); \quad \text{где}$$
$$z = 3,118 + 1,455x_1 - 0,218x_2 + 0,053x_3, \quad (3.2)$$

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.

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 (3.2) представлены в табл.29.

Результаты классификации исследуемых по вероятности наступления беременности, подтвержденной анализом крови на ХГЧ, в зависимости от значений функции (3.2)

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

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).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Информативность показателей спермограммы при прогнозировании результатов ЭКО

Результаты, приведенные в разделе 3.1, позволяют внести существенные уточнения в построение прогноза наступления оплодотворения в результате проведения процедуры ЭКО, применяемой в ходе лечения мужского бесплодия. Важным подспорьем в ходе обсуждения результатов всех разделов работы являются данные статистического анализа, изложенные в разделе 3.5.

Приведенные в табл. 3 результаты указывают, что у большинства пациентов всех возрастных групп показатели спермограммы (объем материала, концентрация клеток, процент прогрессивно-подвижных форм типа PR, доля клеток с нормальной морфологией и содержание округлых клеток) находятся в пределах референсных значений, установленных в Рекомендация ВОЗ в 2010 г. [119]. 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. Этот результат практически полностью соответствует данным российских авторов [34].

Результаты статистической обработки также позволили оценить значение показателей спермограммы для прогнозирования результатов ЭКО (табл.19): два показателя (концентрация сперматозоидов в эякуляте и процент клеток с нормальной морфологией) достоверно влияли на эффективность ЭКО. Этот результат в свою очередь согласуется с данными, полученными зарубежными исследователями, доказавшими, что вероятность оплодотворения как в физиологических условиях, так и в ходе ЭКО напрямую зависит от концентрации спермиев с нормальной морфологией, что обусловило требование британских и американских специалистов к ужесточению рекомендаций ВОЗ при оценке референсных значений спермограммы [71].

Результаты работы позволяют утверждать, что даже традиционные наиболее распространенный вариант спермограммы позволяет получить крайне важную достоверную информацию, которая может быть использована при прогнозировании результатов лечения мужской инфертильности с использованием ЭКО. Это результат подтверждает надежность и валидность показателей классической спермограммы и не совпадает с предложениями отказа от неё в силу низкой информативности и замены показателей классической спермограммы на функциональные показатели [83].

Вместе с тем, результаты раздела 3.1. 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 (табл.4 и 5). Обнаружение ряда типичных патогенов (например, вируса герпеса), играющих важнейшую роль в поражении простаты и развитии простатита [5,33] сопровождается развитием простатита с

формированием АФК, продукцией множества медиаторов воспаления. Ранее аналогичные результаты были получены для вируса папилломы [17]. Этой концепции патогенеза мужской инфертильности хорошо соответствует найденное в ходе работы возрастное повышение содержания лейкоцитов в эякуляте, а также изменения уровня провоспалительных цитокинов в семенной плазме (табл. 4 и рис.5).

Вместе с тем, наличие иммуноглобулинов классов IgG и IgA на поверхности сперматозоидов установлено лишь в 3,3-5,0 и 3,9-4,0 %% случаев, соответственно (табл.4). Хотя уровень IgG повышался с возрастом, полученные показатели лишь частично соответствуют некоторым оценкам о главенствующей роли аутоиммунных процессов в патогенезе мужского бесплодия и не подтверждают оценку в 17,5% иммунопатологических механизмов в общей структуре мужского бесплодия [11]. Тем более, что согласно полученным результатам не наблюдается статистической зависимости между уровнем агглютинации спермиев и обнаружением на их поверхностях антител классов IgG или IgA.

Что касается роли локализованного на мембранах сперматозоидов IgA в патогенезе мужской инфертильности, то этот вопрос требует дальнейших исследований. Проблема заключается в отсутствии данных об участке связывания IgA со сперматозоидами. Если патогенетическая роль IgA в аутоиммунных реакциях в принципе не описана с момента открытия до настоящего времени [18], а в последние годы развитие аутоиммунных патологий связывают как раз с дефицитом IgA [97], то наличие IgA на мембранах сперматозоидов может быть следствием его связывания с другими (например, вирусными) детерминантами в ходе реакций нейтрализации вирусов. При этом важно оценить молекулярную форму, в которой IgA обнаруживается на поверхности сперматозоидов. Если IgA присутствует на спермиях в мономерной форме, то можно рассматривать его уровень как критерий разрушения целостности гемато-тестикулярного барьера, а само связывание может происходить непосредственно в семеннике

или в эпидидимисе. Если IgA на поверхности спермиев будет обнаружен в димерной или тетрамерной формах, то это будет косвенно свидетельствовать о его транспорте через однослойный железистый эпителий, обладающий способностями к димеризации IgA, его снабжению секреторным компонентом и транспорту на поверхность эпителия. В этом случае наиболее вероятным участком связывания IgA со сперматозоидами будут придаточные железы семявыносящих путей и простата. Так или иначе, но вопрос о роли IgA и IgG в патогенезе мужского бесплодия остается открытым.

4.2. Оценка жизнеспособности сперматозоидов и прогнозирование результатов ЭКО

Проведенный статистический анализ данных раздела 3.2. обеспечил получение новых результатов, касающихся патогенетических механизмов мужского бесплодия и их прогностической значимости в ходе ЭКО.

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 NPA, а также различных зондов (DiOC₆(3) для оценки мембранного потенциала митохондрий, SYTO16 green для оценки целостности мембраны и плотности упаковки его ядерного хроматина, Родамина-123 для оценки состояния акросомального аппарата и митохондрий) позволило получить новые сведения о молекулярных и клеточных механизмах дисфункции сперматозоидов, ведущих к снижению их оплодотворяющей способности.

Приведенные в разделе 3.2. результаты указывают, что изменение мембранного потенциала митохондрии, немедленно приводящее к изменениям состава углеводов гликокаликса и сопутствующему снижению заряда плазмалеммы сперматозоида всегда предшествуют другим

изменениям гамет и являются самым жестким критерием их жизнеспособности (табл. 7, 9 и 10). В силу отсутствия ранее метода оценки состава гликокаликса сперматозоидов данный результат получен впервые и аналогичные данные в литературе отсутствуют.

Однако полученные в работе результаты по упаковке ядерного хроматина, состоянию акросомы спермия и его энергетического аппарата полностью соответствуют литературным данным. Так, ранее показано, что сперматозоиды, достигшие эпидидимиса, содержат некомпактную нить ДНК, что делает их инертными [107], что подтвердилось в ходе работы с использованием красителя SYTO16 green и объективного учета в ходе проточного цитометрии. Результаты отечественных авторов позволяли предполагать, что воздействие АФК на созревающие и зрелые сперматозоиды нарушает работу митохондрий и сокращают энергетический резерв клетки, что приводит к снижению подвижности, а также нарушают работу акросомы и уменьшают способность спермиев к пенетрации [12]. Эта гипотеза также получила прямое экспериментальное подтверждение при окрашивании клеток DiOC₆(3) и Родамином-123.

Полученные результаты также позволяют выдвинуть новую гипотезу о последовательности альтерации сперматозоидов, ведущей к развитию мужской инфертильности. Можно предполагать, что первыми событиями, свидетельствующими о снижении оплодотворяющей способности спермиев, являются изменение заряда мембраны, сопряженное с изменением состава их гликокаликса, и состоянием распознающего аппарата спермия. Эти изменения выявляются лектином NPA. Снижение мембранного потенциала митохондрии спермия ведет к выраженному уменьшению его подвижности и оплодотворяющей способности и выявляется при окрашивании красителем DiOC₆(3). 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. Наконец, разрушение

структуры хроматина и снижение уровня продукции АТФ в митохондриях 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, согласно литературным данным, самым обратимым и меняющимся в широких пределах на стадии раннего апоптоза является митохондриальный потенциал. Остальные показатели варьируют в очень узких пределах, что косвенно указывает на необратимость связанных с ними изменений.

Проведенный статистический анализ позволил связать между собой значимость показателей концентрации сперматозоидов в эякуляте и их жизнеспособности (уравнение 3.1. раздела 3.5.), выразить её линейной зависимостью, представленной на рис. 7. Исходя из значения коэффициента регрессии, увеличение концентрации сперматозоидов на 1 млн/мл позволяет предположить рост содержания жизнеспособных сперматозоидов в нативном эякуляте на 0,17%.

В ходе работы было установлено, что криоконсервация сперматозоидов ведет к снижению их жизнеспособности по меньшей мере в 2 раза. Это снижение характерно для всех использованных сред, которые между собой не различаются достоверно по выходу жизнеспособных клеток после процедуры замораживания-оттаивания (табл. 8). Тем не менее, наилучшие условия хранения сперматозоидов обеспечивала модифицированная среда Квина. Аналогичные результаты были получены в работах зарубежных авторов [60,104].

Существенный практический результат исследования получен при оценке результатов криоконсервации сперматозоидов мужчин разных возрастов (табл. 16). Для всех использованных критериев жизнеспособности сперматозоидов именно модифицированная среда Квина обеспечивала

наилучшее сохранение митохондриального потенциала, упаковки ядерного хроматина, акросомального аппарата или состава и плотности структур гликокаликса. Эта среда также была наиболее эффективной для криоконсервации клеток мужчин 26-29 лет. Однако для криоконсервации сперматозоидов лиц в возрасте 35-47 лет по трем из четырех критериев оптимальной оказалась среда Vitrolife. При этом существенно, что промежуточная по возрасту обследованных лиц группа 30-34 года показала промежуточные результаты и по средам для криоконсервации: среда Квина обеспечивала сохранение плотности гликокаликса и митохондриального потенциала, в то время как среда Vitrolife создавала оптимальные условия для сохранения акросомального комплекса и упаковки ядерного хроматина.

Результаты цитометрической оценки жизнеспособности сперматозоидов позволяют составить прогноз оплодотворения как в стандартной процедуре ЭКО, так и при использовании технологии ICSI (табл. 9 и 10). Статистически достоверная зависимость обнаружена между вероятностью наступления беременности после стандартной процедуры ЭКО и оценкой жизнеспособности спермиев с использованием лектина NPA. Для остальных зондов в ходе классического варианта ЭКО такой зависимости не обнаружено. Также зависимости не найдено ни для одного зонда (включая лектин NPA) при использовании для оплодотворения технологии ICSI, для осуществления которой жизнеспособность и подвижность сперматозоида не критичны в силу самого принципа данной технологии.

4.3. Возрастной аспект мужского бесплодия и прогнозирование результатов ЭКО

Анализ возрастных изменений оплодотворяющей способности сперматозоидов является одним из традиционных направлений исследований в рамках клинических и экспериментальных исследований. Более того, можно утверждать, что проблема возрастного снижения мужской фертильности и поиск способов её коррекции были предметом врачебных

изысканий с момента становления самой медицины как науки. Однако объективные подходы, результаты которых можно сопоставить с современными наблюдениями, стали применяться только в начале 1950-х гг. [86].

Обобщая принципиальные подходы к данной проблеме и более частные литературные сведения по конкретным вопросам, можно убедиться, что все они укладываются в предложенный В. М. Дильманом интегральный четырёхкомпонентный механизм старения [14], который автор считал краеугольным камнем предложенной им интегральной модели медицины. В. М. Дильман не без оснований считал, что процесс старения охватывает молекулярный, клеточный, системный и организменный уровни организации, а среди механизмов старения выделял онтогенетические механизмы (заложенные в геноме человека, например, укорочение теломерных участков хромосом), аккумуляционные механизмы (связанные с накоплением изменений в геноме, рецепторном аппарате или межклеточных структурах) и экологические механизмы (связанные с длительным воздействием внешних токсикантов). Гипотеза В. М. Дильмана по сути дела предвосхитила концепцию инфламмейджинга - хронического контролируемого подострого бессимптомного воспаления, ассоциированного со старением, появилась в 2000 г. и вскоре стала одним из наиболее продуктивных направлений исследований [64].

Так, применительно к проблеме мужского бесплодия аккумуляционными и экологическими причинами являются длительное воздействие активных форм кислорода [84], хронические вирусные инфекции [17], возрастное снижение продукции тестостерона [103], нарушения обмена веществ, связанные, как правило, с диабетом и ожирением [13].

Результаты проведенного исследования не рассматривают вопрос о причинах возрастных изменений, но дают новые сведения об их проявлениях у мужчин 26 – 47 лет. Использование различных красителей для оценки

жизнеспособности сперматозоидов позволяет получить дополнительные важные сведения о возрастных изменениях гамет. 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 гаметы: окрашивание зондом DIOC₆(3) свидетельствует об ослаблении энергетической эффективности митохондрии примерно на 1% в год. 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, сопровождающееся понижением жизнеспособности гамет, 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.6). 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.

4.4. Изменения состава семенной плазмы и прогнозирование результатов ЭКО

На протяжении многих лет, до появления методов проточной цитометрии и различных модификаций генетического анализа, именно изучение семенной плазмы было важнейшим направлением экспериментальных и клинических исследований. Первые работы по

биохимии СП были выполнены ещё в начале XX века, в то время как планомерное изучение СП в связи с мужской инфертильностью началось после окончания Второй мировой войны [54,87].

Особое значение параметрам СП придается в связи с ролью простатита в развитии мужского бесплодия [5]. У больных простатитом в составе СП обнаружены изменения множества биохимических и иммунологических показателей, отражающих длительность и глубину воспалительного процесса, которые могут оказать существенное влияние на мужскую фертильность [17]. Тем не менее, следует признать, что в последние годы в мировой литературе наметилась тенденция перехода к анализу других компонентов СП, отличных от традиционного набора транспортных белков и цитокинов воспаления. К их числу относятся нуклеотидазы СП, способные изменить состояние хроматина спермия и его митохондрии [56,63], многочисленные малые молекулы, влияющие на энергетический обмен сперматозоидов [82], микроэлементы [88], а также по-прежнему активные формы кислорода и продукты перекисного окисления липидов [37,81].

Полученные в работе результаты полностью соответствуют этим тенденциям. Например, низкие концентрации IL-1 β и IL-6 в семенной плазме соответствуют критериям отбора пациентов, поскольку лица с острой формой инфекционно-воспалительных заболеваний из исследования исключались, а также все участники проходили перед проведением ЭКО длительную подготовку, обеспечившую переход хронического простатита в компенсированную форму (рис.5). Тем не менее, в группе пациентов с низким процентом наступивших беременностей выявлено достоверное повышение уровня IL-8 в СП (рис.5), что полностью согласуется с умеренным лейкоцитозом эякулята и может быть проявлением процесса инфламмейджинга.

Важной с точки зрения прогнозирования результатов ЭКО представляется найденная статистическая зависимость между высокой вероятностью успеха ЭКО и наступления беременности и высоким

содержанием СЗ компонента комплемента в семенной плазме и обратное соотношение в случае низкого уровня СЗ в СП (рис.5 и табл. 18). Этот факт может иметь два возможных объяснения. С одной стороны, низкий уровень синтезируемого в печени СЗ 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 СЗ. С другой стороны, СЗ является не только компонентом каскада комплемента, но и одним из эффективных опсонов, 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.

Найденное достоверное повышение уровня АМГ в семенной плазме в группе с низкой вероятностью успеха ЭКО заслуживает определенного внимания, но требует проведения дальнейших исследований, поскольку не сопровождается наличием достоверной корреляции между уровнем АМГ в СП и вероятностью успеха в ходе ЭКО. Следовательно, обнаружение заметных концентраций АМГ в СП, с поддержанием продукции которого ещё недавно связывали перспективы длительного поддержания функции герминативного эпителия [123] может косвенно свидетельствовать о глубоких дисфункциях репродуктивной системы у мужчин. Аналогичное заключение было сделано в 2017 г. в США [85].

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 C3 компонента комплемента в семенной плазме: вероятность оплодотворения был тем ниже, чем ниже был уровень C3. Этот результат подтверждает как важную роль C3 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 сокращений

- АМГ – антимюллеровский гормон
- АФК – активные формы кислорода
- ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
- ДИ – доверительный интервал
- ДМСО - диметилсульфоксид
- ЗППП – заболевания, передающиеся половым путем
- ЗФР – забуференный физиологический раствор
- ИФА - иммуноферментный анализ
- СП – семенная плазма
- ХГЧ – хорионический гонадотропин человека
- ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение
- С' – каскад комплемента
- С1q – компонент комплемента С1q
- С3 – компонент комплемента С3
- CD - кластер дифференцировки
- DiOC₆(3) – краситель йодид 3,3'-дигексилотетракарбоцианина
- FCS – фетальная телячья сыворотка
- FITC - флуоресцеинизотиоцианат
- FS – прямое светорассеяние
- GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- HGF – фактор роста гепатоцитов
- ICSI - метод интрацитоплазматического введения сперматозоида
(*IntraCytoplasmic Sperm Injection*, ICSI), один из вариантов ЭКО
- IL - интерлейкин
- ILGF-1 – инсулиноподобный ростовой фактор-1
- NPA – лектин нарцисса
- PAF - фактор активации тромбоцитов
- PI – йодид пропидия
- RANTES – хемокин CC-подкласса

Rh123 - родамин-123

SS – боковое светорассеяние

SYTO16 green – краситель SYTO16 green

TGF- β - трансформирующий ростовой фактор- β

TMRM – краситель тетраметилродамин

TNF α - фактор некроза опухолей- α

TQ – эмбрионы высокого качества (*Top Quality Embryos*)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамов, М.М. Начало исследований в области ЭКО в СССР / М.М.Адамов, Н.Ю.Ткачева, В.А.Королев, З.А.Турлинова, П.Л.Золотаревский // Проблемы репродукции. – 2011. – Т.17, № 5. – С.14-20.
2. Алчинбаев, М.К. Оценка эффективности микрохирургической субингвинальной варикоцелэктомии в лечении пациентов с олигоастенозооспермией / М.К.Алчинбаев, М.А.Макажанов, И.Т.Мухамеджан, К.Ж. Маскутов // Вестник урологии. – 2016. – №1. – С.5-11.
3. Аполихин, О.И. Анализ уронефрологической заболеваемости в Российской Федерации по данным официальной статистики / О.И.Аполихин, А.В.Сивков, Д.А.Бешлиев, Т.В.Солнцева, В.А.Комарова // Экспериментальная и клиническая урология. – 2010. – №1. – С.4–11.
4. Божедомов, В.А. Мужской фактор бездетного брака – пути решения проблемы // Урология. – 2016. – №1 (Приложение 1). – С.28–34.
5. Божедомов, В.А. Современные возможности лечения хронического простатита // Андрология и генитальная хирургия. – 2016. – Т.17, №3. – С.10–22.
6. Божедомов, В.А. Причины оксидативного стресса сперматозоидов / В.А.Божедомов, Д.С.Громенко, И.В.Ушакова, М.В.Торопцева, Ш.Н.Галимов, Е.Л.Голубева, Т.А.Охтырская, Л.А.Александрова, Г.Т.Сухих // Проблемы репродукции. – 2008. – Т.14, №6. – С. 67-73.
7. Божедомов, В.А. Влияние биологически активной добавки "Андродоз"® на показатели спермограммы у мужчин с идиопатическим бесплодием в форме олигозооспермии в сочетании с астено- и/или тератозооспермией: данные открытого рандомизированного многоцентрового проспективного исследования / В.А.Божедомов, А.А.Камалов, Г.Е.Божедомова, В.И.Козлова, Р.А.Камарина, Е.А.

Епанчинцева // Андрология и генитальная хирургия. – 2019. – Т.20, № 1. – С.108-119.

8. Божедомов, В.А. Роль структурных нарушений хроматина и ДНК сперматозоидов в развитии бесплодия / В.А.Божедомов, Н.А.Липатова, Е.А.Спориш, И.М.Рохликов, И.В. Виноградов // Андрология и генитальная хирургия. – 2012. – Т.13, №3. – С.82-92.

9. Божедомов, В.А. Этиопатогенез аутоиммунных реакций против сперматозоидов / В.А.Божедомов, М.А.Николаева, Е.А.Спориш, И.М.Рохликов, Н.А.Липатова, И.В.Ушакова, Н.С.Логинова, Г.Т.Сухих // Андрология и генитальная хирургия. – 2012. – Т.13, №4. – С.45-53.

10. Божедомов, В.А. Роль процессов свободно–радикального окисления в патогенезе мужского иммунного бесплодия / В.А.Божедомов, М.А.Николаева, И.В.Ушакова, А.Ш.Мингболатов, Л.М.Александрова, Н.А.Липатова, Е.Л.Голубева, О.В.Теодорович, Г.Т.Сухих // Андрология и генитальная хирургия. – 2010. – Т.11, № 4. – С.62-66.

11. Божедомов, В.А. Актуальные вопросы оказания помощи парам с мужским фактором бездетного брака: клинические и организационно-методические аспекты / В.А.Божедомов, И.М.Рохликов, А.А.Третьяков, Н.А.Липатова, И.В.Виноградов, Е.Л. Никонов // Андрология и генитальная хирургия. – 2013. – №4. – С. 7-16.

12. Божедомов, В.А. Активные формы кислорода и репродуктивная функция мужчин: фундаментальные и клинические аспекты (обзор литературы) / В.А.Божедомов, М.В.Торопцева, И.В.Ушакова, Е.А.Спориш, Н.А.Ловыгина, Н.А. Липатова // Андрология и генитальная хирургия. – 2011. – № 3. – С. 10-16.

13. Гамидов, С.И. Мужское здоровье и ожирение – диагностика и терапевтические подходы / С.И.Гамидов, Т.В.Шатылко, Н.Г. Гасанов // Ожирение и метаболизм. – 2019. – Т.16, №3. – С.29-36.

14. Дильман, В.М. Четыре модели медицины. – Л.: Медицина, 1987.– 288 с.

15. Жайтлеуов, Г.Х. Варикоцеле, как одна из причин мужского бесплодия // Вестник хирургии Казахстана. – 2011. – №2. – С.100-101.
16. Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. Прикладная медицинская статистика. М.: Фолиант, 2006.
17. Ибишев, Х.С. Идиопатическое мужское бесплодие и папилломавирусная инфекция / Х.С.Ибишев, Н.Н.Рябенченко, Г.А.Магомедов // Вестник урологии. – 2019. – Т.7, № 2. – С.51-58.
18. Иммуноглобулины / под ред. Г.Литмен и Р.Гуда.- М.: Мир, 1981.- 496 с.
19. Карпов Е.И., Ананьин А.М., Ананьин Б.А. О чем говорит спермограмма: Методические рекомендации. Рязань, 2015. 22 с.
20. Коган, М. И. Варикоцеле: противоречия проблемы / М. И.Коган, А.Афоко, Дж.Тампуори, А.Асанти-Асамани, О.И.Пипченко // Урология. – 2009. – №6. – С.67-72.
21. Кульченко, Н.Г. Воспаление и мужское бесплодие. что общего? //Вестник РУДН. Серия: Медицина. – 2017. – Т.21, №4. – С. 402—407.
22. Логинова, Н.С. Патогенез мужского иммунного бесплодия / Н.С.Логинова, Г.Т.Сухих, М.А.Николаева, Н.К.Матвеева, Л.Файзуллин, О.В.Теодорович, Н.А.Липатова, В.Н.Верясов, В.А.Божедомов, И.Ю.Замилацкая, А.В.Самко // Проблемы репродукции. – 2006. – Т.12, № 5. – С.51-59.
23. Наследов, А.Д. SPSS 19: профессиональный статистический анализ данных.- М.: Питер, 2011.
24. Николаева, М.А. Оценка акросомной реакции при диагностике бесплодия / М.А.Николаева, Е.Л.Голубева, И.В.Ушакова, Л.В.Ванько, В.А.Божедомов, Г.Т. Сухих // Акушерство и гинекология. – 2010. – № 5. – С.68-72.
25. Огурцов, Р.П. О значении пассивной сенсбилизации перекрестно-реагирующими антителами и активной иммунизации перекрестно-реагирующими микробными антигенами для развития

иммунопатологического процесса // Вестн. АМН СССР. – 1974. – № 11. – С. 30 – 34.

26. Оль Д., Шустер Т., Кволич С. Мужское бесплодие. / В кн.: Репродуктивная медицина и хирургия. Под ред. Т. Фальконе, В. Херд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. С. 616–631.

27. Павлов, В.Н. Молекулярные и метаболические аспекты мужского бесплодия / В.Н.Павлов, Э.Ф.Галимова, Б.Ф.Терегулов, В.Т.Кайбышев, Ш.Н.Галимов // Вестник урологии. – 2016. – Т.4, №2. – С.40-59.

28. Петров, Г.Н. Оплодотворение и первые этапы расщепления человеческого яйца *in vitro* // Архив АГЭ. – 1958. – Т.35, № 1.– С.88-91.

29. Плавинский, С.Л. Биостатистика: планирование, обработка и представление результатов биомедицинских исследований при помощи системы SAS. - СПб.: СПбМАПО, 2005.

30. Сапаргалиева, А.Д. Морфологические аспекты мужского бесплодия // Вестник КазНМУ. – 2014. – №2(2) – С.212-216.

31. Сухих Г.Т., Божедомов В.А. Иммунное мужское бесплодие. М.:Е-нот, 2018. 80 с.

32. Сухих, Г.Т. Проблемы диагностики иммунологической причины мужского бесплодия / Г.Т.Сухих, М.А.Николаева, Е.Л.Голубева, Л.Файзуллин, О.В.Теодорович, В.А.Божедомов, Е.И.Бокарева, А.А. Самко // Проблемы репродукции. – 2007. – Т.13, № 2. –С.81-89.

33. Шевырин, А.А. Современный взгляд на лечение нарушений мужской фертильной функции // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2018. – № 12. – С. 30 – 35.

34. Ширшов, В.Н. Современное состояние проблемы мужского бесплодия: обзор клинических рекомендаций европейской ассоциации урологов // Клиническая практика. – 2016. – № 1. – С.39-49.

35. Ярилин А.А., Иммунология, М.:Геотар, 2010.

36. Agarwal, A. Markers of oxidative stress and sperm chromatin integrity / Agarwal A, Varghese AC, Sharma RK. // *Methods Mol. Biol.* 2009. –V.590. P.377–402.
37. Agarwal, A. MiOXSYS: a novel method of measuring oxidation reduction potential in semen and seminal plasma / A.Agarwal, R.Sharma , S.Roychoudhury , S.Du Plessis , E.Sabanegh // *Fertil. Steril.* – 2016. – V.106, №3.– P.566-573.
38. Aitken, R.J. On the nature of semen quality and infertility / R.J. Aitken, H.W. Baker, D.S.Irvine // *Hum. Reprod.* –1995.– V.10, №2.– P.248–249.
39. Aitken, R.J. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa / R.J. Aitken, Z. Gibb, M.A. Baker, J. Drevet, P. Gharagozloo // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2016. – V. 28, № 1-2. – P.1-10.
40. Aitken, R.J. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa / R.J. Aitken, E. Gordon, D. Harkiss, J.P. Twigg, P. Milne, Z. Jennings, D.S.Irvine // *Biol. Reprod.* – 1998.– V.59, №5.– P.1037–1046.
41. Aitken, R.J. Maturation of redox regulatory mechanisms in the epididymis / R.J. Aitken, P.Vernet // *J. Reprod. Fertil. Suppl.* – 1998. – V.53. – P.109–118.
42. Aitken, R.J. Possible redox regulation of sperm motility activation // *J. Androl.* – 2000. – V.21, №4.– P.491–496.
43. Almeida, S. Fertility and Sperm Quality in the Aging Male / S.Almeida, L.Rato, M.Sousa, M.G.Alves, P.F. Oliveira // *Curr. Pharm. Des.* –2017. – V.23, №30. – P.4429-4437.
44. Amaral, S. Aging and male reproductive function: a mitochondrial perspective / S.Amaral, A.Amaral, J. Ramalho-Santos // *Front. Biosci. (Schol Ed).* – 2013. – V.5. – P.181-197.
45. Amaral, S. Aging, mitochondria and male reproductive function / S.Amaral, J.Ramalho-Santos // *Curr. Aging Sci.* – 2009. – V.2, № 3.– P.165-173.
46. Anderson, D.J. Trophoblast/leukocyte-common antigen is expressed by human testicular germ cells and appears on the surface of acrosome-reacted sperm

/ D.J.Anderson, J.S.Michaelson, P.M. Johnson // Biol. Reprod. – 1989. – V.41, №2. – P.285–293.

47. Austin, C.R. Observations of the penetration of sperm into the mammalian egg // Austral. J. Sci. Res. Series B. – 1951. – V.4. – P.581-596.

48. Baird, D.T. Fertility and ageing / D.T.Baird, J.Collins, J.Egozcue, L.H.Evers, L.Gianaroli, H.Leridon, A.Sunde, A.Templeton, A.Van Steirteghem, J.Cohen, P.G.Crosignani, P.Devroey, K.Diedrich, B.C.J.M.Fauser, L.Fraser, A.Glasier, I.Liebaers, G.Mautone, G.Penney, B.Tarlatzis // Hum. Reprod. Update. – 2005. – V.11, №3. – P.261-276.

49. Barazani, Y. Functional Sperm Testing and the Role of Proteomics in the Evaluation of Male Infertility / Y.Barazani, A.Agarwal, E.Sabanegh // Urology. – 2014. – V. 84, № 2. – P. 255–261.

50. Belloc, S. High body mass index has a deleterious effect on semen parameters except morphology: results from a large cohort study / S.Belloc, M.Cohen-Bacrie, E.Amar, V.Izard, M.Benkhalifa, A.Dalleac, J.de Mouzon // Fertility and Sterility. – 2014. – V. 102, №5. – P.1268-1273.

51. Björndahl, L. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment / L.Björndahl, I.Söderlund, U.Kvist // Hum. Reprod. – 2003. – V.18, №4. – P.813-816.

52. Cabot, C.L. The Possible Role of Immunological Complement in Induction of Rabbit Sperm Acrosome Reaction // C.L.Cabot, G.Oliphant / Biol. Reprod. – 1978. – V.19, № 3. – P.666-672.

53. Castedo, M. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis / M.Castedo, K.Ferri, T.Roumier, D.Metivier, N.Zamzami, G.Kroemer // J. Immunol. Methods. – 2002. – V.265, №1-2. – P.39-47.

54. Chang, M.C. Effects of heterologous seminal plasma and sperm cells on fertilizing capacity of rabbit spermatozoa // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. –1949. – V.70, №1.– P.32-36.

55. Chang, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes // Nature. – 1951.– V.168, № 4277. – P.697-698.

56. Chen, Y. Seminal plasma cell-free mitochondrial DNA copy number is associated with human semen quality / Y.Chen, T.Liao, L.Zhu , X.Lin, R.Wu, L.Jin // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2018 – V.231. – P.164-168.
57. Cottet-Rousselle, C. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes / C.Cottet-Rousselle, X.Ronot, X.Leverve, J.-F.Mayol // *Cytometry Part A.* – 2011. –V.79A, №6. – P.405-425.
58. Cummins, J.M. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters / J.M.Cummins, S.M.Pember, A.M. Jequier // *J. Androl.* – 1991. – V. 12, № 2. – P. 98-103.
59. Davidson, L.M. Deleterious effects of obesity upon the hormonal and molecular mechanisms controlling spermatogenesis and male fertility / L.M. Davidson, K. Millar, C.Jones, M. Fatum, K. Coward // *Hum. Fertil. (Camb).* – 2015. – V.18, №3. – P.184-193.
60. de la Fuente-Lara, A. Effects from aging on semen quality of fresh and cryopreserved semen in Labrador Retrievers / A.de la Fuente-Lara, A.Hesser, B.Christensen, K.Gonzales, S.Meyers // *Theriogenology.* – 2019. – V.132. – P.164-171.
61. Edwards, R.G. Fertilization and cleavage in vitro of preovulatory human oocytes / R.G.Edwards, P.C.Stepto, J.M. Purdy // *Nature.* – 1970. – V. 227, №5265. – P.1307-1309.
62. Fang, F. Human induced pluripotent stem cells and male infertility: an overview of current progress and perspectives / F.Fang, Z.Li, Q.Zhao, H.Li, C.Xiong // *Hum. Reprod.* – 2018. – V.33, №2. – P.188-195.
63. Fernandez-Encinas, A. Characterization of Nuclease Activity in Human Seminal Plasma and its Relationship to Semen Parameters, Sperm DNA Fragmentation and Male Infertility / A.Fernandez-Encinas, A.García-Peiró, J.Ribas-Maynou, C.Abad, M.José Amengual, J.Navarro, J.Benet // *J. Urol.* –2016. – V.195, №1. – P.213-219.

64. Franceschi, C. Inflamm-aging. An Evolutionary Perspective on Immunosenescence / C.Franceschi, M.Bonafè, S.Valensin, F. Olivieri, M.De Luca, E. Ottaviani, G. De Benedictis // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2000. – V. 908, № 1. – P. 244–254.
65. Frattarelli, J.L. Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles / J.L.Frattarelli, K.A.Miller, B.T.Miller, K.Elkind-Hirsch, R.T. Scott // *Fertil. Steril.* – 2008. – V.90, №1. – P.97-103.
66. Ghosh, A. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction / A. Ghosh, L.Gao, A.Thakur, P.M. Siu, C.W. K. Lai // *J. Biomed. Sci.* – 2017. – V.24, №1. – P. 50.
67. Glantz, S.A. *Primer of Biostatistics*. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2011.
68. Gomendio, M. Sperm traits and male fertility in natural populations / M.Gomendio, A.F.Malo, J.Garde, E.R.S. Roldan // *Reproduction.* – 2007. – V.134, №1. – P.19-29.
69. Greenhall, E. The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies / E.Greenhall, M.Vessey // *Fertil. Steril.* – 1990. – V.54, №6. – P.978–983.
70. Guo, D. The impact of BMI on sperm parameters and the metabolite changes of seminal plasma concomitantly / D.Guo, W.Wu, Q.Tang, S.Qiao, Y.Chen, M.Chen, M.Teng, C.Lu, H.Ding, Y.Xia, L.Hu, D.Chen, J.Sha, X.Wang// *Oncotarget.* – 2017. – V.8, №30. – P.48619-48634.
71. Guzick, D.S. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men / D.S.Guzick, J.W.Overstreet, P.Factor-Litvak // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – V. 345, № 19. – P. 1388-1393.
72. Handelsman, D.J. Male reproductive ageing: human fertility, androgens and hormone dependent disease // *Novartis Found Symp.* – 2002. – V.242. – P.66-81.
73. Hedger, M.P. Cytokines and the immune-testicular axis / M.P.Hedger, A.Meinhardt // *J. Reprod. Immunol.* – 2003 – V.58, №1. – P.1–26.

74. Isobe, T. The effect of RANTES on human sperm chemotaxis / T.Isobe, H.Minoura, K.Tanaka, T.Shibahara, N.Hayashi, N.Toyoda // *Human Reproduction*. –2002. – V. 17, №. 6. – P. 1441-1446.
75. Jeyendran, R.S. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics / R.S.Jeyendran, H.H.Van der Ven, M.Perez-Pelaez, B.G.Crabo, L.J.Zaneveld // *J. Reprod. Fertil.* –1984. – V.70, №1. – P.219-228.
76. Johnson, L. Influence of age on sperm production and testicular weights in men / L.Johnson, C.S.Petty, W.B. Neaves // *J. Reprod. Fertil.* – 1984. – V.70, №1. – P.211-218.
77. Johnson, L.V. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123 / L.V.Johnson, M.L.Walsh, L.B. Chen // *PNAS*. – 1980. – V.77, №2. – P.990–994.
78. Johnson, M.H. A short history of in vitro fertilization (IVF) // *Int. J. Dev. Biol.* – 2019. – V.63, № 3-4-5. – P.83-92.
79. Johnson, P.M. Human trophoblast-specific surface antigens identified using monoclonal antibodies / P.M.Johnson, H.M.Cheng, C.M.Molloy, C.M.M.Stern, M.B. Slade // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 1981. – V.1, № 5. –P. 246–254.
80. Kemal Duru, N. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa / N.Kemal Duru, M.Morshedi, S.Oehninger // *Fertil. Steril.* – 2000. – V.74, № 6. – P. 1200–1207.
81. Kumar, N. Reactive oxygen species in seminal plasma as a cause of male infertility / N.Kumar, A.Kant Singh// *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* –2018. – V.47, № 10. – P.565-572.
82. Lazzarino, G. Low-molecular weight compounds in human seminal plasma as potential biomarkers of male infertility / G.Lazzarino, I.Listorti, L.Muzii, A.M.Amorini, S.Longo, E.Di Stasio, G.Caruso, S.D'Urso, I.Puglia, G.Pisani, G.Lazzarino, B.Tavazzi, P.Bilotta // *Hum. Reprod.* – 2018. – V.33, № 10. – P.1817-1828.

83. Lefievre, L. Counting sperm does not add up any more: time for a new equation? / L.Lefievre, K.Bedu-Addo, S.J.Conner, G.Machado-Oliveira, Y.Chen, J.C.Kirkman-Brown, M.A.Afnan, S.J.Publicover, W.C.L.Ford, C.L.R.Barratt // *Reprod.* – 2007. – V. 133, № 4. – P. 675-684.
84. Leisegang, K. Redox Regulation of Fertility in Aging Male and the Role of Antioxidants: A Savior or Stressor / K.Leisegang, R.Henkel, A.Agarwal // *Curr. Pharm. Des.* – 2017. – V.23, № 30. – P.4438-4450.
85. Li, N. Associations between Urinary Phthalate Metabolites and Serum Anti-Müller Hormone Levels in U.S. Men Based on National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004 / N.Li, Y.Li, H.Meng, H.Sun, D.Wu // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2017. – V.14, №12. – P.1513.
86. MacLeod, J. The male factor in fertility and infertility. 7. Semen quality in relation to age and sexual activity / J.MacLeod, R.Z.Gold // *Fertil. Steril.* – 1953. – V.4, № 3.– P.194-209.
87. Mann, T. Studies on the metabolism of semen; fructose as a normal constituent of seminal plasma; site of formation and function of fructose in semen // *Biochem. J.* – 1946. – V.40, № 4.– P.481-491.
88. Marzec-Wróblewska, U. Human Sperm Characteristics with Regard to Cobalt, Chromium, and Lead in Semen and Activity of Catalase in Seminal Plasma / U.Marzec-Wróblewska, P.Kamiński, P.Łakota, M.Szymański, K.Wasilow, G.Ludwikowski, L.Jerzak, T.Stuczyński, A.Woźniak, A.Buciński // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2019. – V.188, № 2. – P.251-260.
89. Matorras, R. Decline in human fertility rates with male age: a consequence of a decrease in male fecundity with aging? / R.Matorras, F.Matorras, A.Expósito, L.Martinez, L.Crisol // *Gynecol. Obstet. Invest.* – 2011. – V.71, № 4. – P.229-235.
90. Mazumdar, M.D. Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment / M.D.Mazumdar, A.S. Levine // *Fertil. Steril.* – 1998. – V.70, №5. – P.799-810.

91. Md Saidur Rahman, Prediction of male fertility using capacitation-associated proteins in spermatozoa / Md Saidur Rahman, W.-S.Kwon, M.-G.Pang // *Mol. Reprod. Dev.* – 2017. – V.84, № 9. – P.749-759.
92. Monavari, S.H. Asymptomatic seminal infection of herpes simplex virus: impact on male infertility / S.H.Monavari, M.S.Vaziri, M.Khalili, M.Shamsi-Shahrabadi, H.Keyvani, H.Mollaei, M.Fazlalipour // *J. Biomed. Res.* – 2013. – V.27, № 1. – P.56-61.
93. Naz, P.K. Immunobiologic implication of RANTES in seminal plasma of fertile, infertile and immunoinfertile men / P.K.Naz, M.H. Leslie // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2000. – V.44, № 4. – P.197–204.
94. Neofytou, E. Prevalence of human herpes virus types 1–7 in the semen of men attending an infertility clinic and correlation with semen parameters / E.Neofytou, G.Sourvinos, M.Asmarianaki, D.A.Spandidos, A.Makrigiannakis // *Fertil. Steril.* – 2009. – V.91, № 6. – P.2487-2494.
95. Nickel, J. C. Prostatitis // *Can. Urol. Assoc. J.* – 2011. – V. 5, № 5. – P.306–15.
96. Nikolaeva, M.A. Evaluation of stimulus-induced acrosome reaction by two-colour flow cytometric analysis / M.A.Nikolaeva, E.L.Golubeva, V.I.Kulakov // *Mol. Hum. Reprod.* – 1998. – V. 4, № 3. – P. 243-250.
97. Odineal, D.D. The Epidemiology and Clinical Manifestations of Autoimmunity in Selective IgA Deficiency / D.D.Odineal, M.E.Gershwin // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* – 2020. – V.58, № 1.– P.107-133.
98. Palmer, N.O. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function / N.O.Palmer, H.W.Bakos, J.A.Owens, B.P.Setchell, M.Lane // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2012. – V.302, № 7. – P.E768-E780.
99. Petri A., Sabin C. *Medical statistics at a glance* 3rd ed. London: Wiley-Blackwell; 2013.
100. Pincus, G. Can Mammalian Eggs Undergo Normal Development in Vitro? / G.Pincus, E.V. Enzmann // *PNAS.*– 1934. – V.20, №2. – P. 121-122.

101. Rees, J. Diagnosis and treatment of chronic bacterial prostatitis and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a consensus guideline / J.Rees, M.Abrahams, A.Doble, A.Cooper // *BJU Int.* – 2015.– V.116, № 4. – P.509–525.
102. Rock J, Menkin M (1944). In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs // *Science.* – 1944. – V.100, №2588. – P.105-107.
103. Santiago, J. Testicular Aging: An Overview of Ultrastructural, Cellular, and Molecular Alterations / J.Santiago, J.V.Silva, M.G.Alves, P.F.Oliveira, M.Fardilha // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* – 2019. – V.74, №6. – P.860-871.
104. Schwartz, D. Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men / D.Schwartz, M.J.Mayaux, A.Spira, M.L.Moscato, P.Jouannet, F.Czyglik, G.David // *Fertil. Steril.* – 1983. – V.39, № 4. – P.530-535.
105. Shukla, K.K. Recent scenario of obesity and male fertility / K.K.Shukla, S.Chambial, S.Dwivedi, S.Misra, P.Sharma// *Andrology.* – 2014. – V.2, № 6. – P.809-818.
106. Sigman, M. Introduction: Male fertility testing: the past, present, and future // *Fertil. Steril.* –2019. – V. 111, № 5. – P. 833 – 834.
107. Sotolongo, B. DNA loop domain organization: The three-dimensional genomic code / B.Sotolongo, W.S.Ward // *J. Cell. Biochem. Suppl.* – 2000. – V.9, Suppl 35. – P.23–26.
108. Suarez, S.S. Interaction of Rabbit Spermatozoa and Serum Complement Components / S.S.Suarez, G.Oliphant // *Biol. Reprod.* – 1982. – V.27, № 2. – P.473-483.
109. Tremellen, K. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective // *Hum.Reprod.Update.* – 2008. – V.14, № 3. – P.243–258.
110. Tuttelmann, F. Anti-Mullerian hormone in men with normal and reduced sperm concentration and men with maldescended testes / F.Tuttelmann, N.Dykstra, A.P.Themmen, J.A.Visser, E.Nieschlag, M.Simoni // *Fertil. Steril.* – 2009. – V. 91, № 5. – P.1812–1819.

111. Van Duijn, C. The relationship between some seminal characteristics and ejaculation frequency in the human male / C.Van Duijn, M.Freund // *Eur. J. Obstet. Gynaecol. Reprod. Biol.* – 1971. – V. 1, № 5. – P.167-174.
112. Van Steirteghem, A.C. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection / A.C.Van Steirteghem, Z.Nagy, H.Joris, J.Liu, C.Staessen, J.Smitz, A.Wisanto, P.Devroey // *Hum. Reprod.* – 1993. – V.8, № 7. – P.1061-1066.
113. Wagner, I.V. Prepubertal onset of obesity negatively impacts on testicular steroidogenesis in rats / I.V.Wagner, N.Klötting, N.Atanassova, I.Savchuk, C.Spröte, W.Kiess, O.Söder, K.Svechnikov // *Mol. Cell. Endocrinol.* –2016. – V. 437. – P.154-162.
114. Whittingham, D.G. Fertilization of mouse eggs in vitro // *Nature.* – 1968. – V.220, №5167. – P.592-593.
115. Wlodkowic, D. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances / D.Wlodkowic, J.Skommer, Z.Darzynkiewicz // *Exp. Oncol.* – 2012. – V.34, №3. – P.255-262.
116. Wlodkowic, D. SYTO probes in the cytometry of tumor cell death / D.Wlodkowic, J.Skommer, Z.Darzynkiewicz // *Cytometry A.* – 2008. – V.73, №6. – P.496-507.
117. Wlodkowic, D. Towards an understanding of apoptosis detection by SYTO dyes /D.Wlodkowic, J.Skommer, J.Pelkonen // *Cytometry A.* – 2007. – V.71, №2. – P.61-72.
118. Wlodkowic, D. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death / D.Wlodkowic, W.Telford, J.Skommer, Z.Darzynkiewicz // *Methods Cell. Biol.* – 2011. – V.103,№1. – P.55-98.
119. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 5th ed. Cambridge University Press; 2010.

120. World Health Organization. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2000.
121. Wyrobek, A.J. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm / A.J.Wyrobek, B.Eskenazi, S.Young, N.Arnheim, I.Tiemann-Boege, E.W.Jabs, R.L.Glaser, F.S.Pearson, D.Evenson //PNAS. – 2006. – V.103, № 25. – P.9601-9606.
122. Yu, B. Variations in Antioxidant Genes and Male Infertility / B.Yu, Z.Huang // Biomed. Res. Int. – 2015. – V.2015.– P.513196.
123. Zec, I. Anti-Müllerian hormone: a unique biochemical marker of gonadal development and fertility in humans / I.Zec, D.Tislarić-Medenjak, Z.Bukovec Megla, I.Kučak // Biochem. Med. (Zagreb). – 2011. – V.21, №3. – P.219-230.
124. Zitzmann, M. Effects of age on male fertility // Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. – 2013. – V.27, № 4.– P.617-628.