

УДК 616.697:612.616.2

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМАТОЗОИДОВ
ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭКСКРЕТОРНОГО БЕСПЛОДИЯ У МУЖЧИН**

А.К. Абаралиев, Г.С. Чернецова, Ч.Б. Алимов, Ж.К. Райымбеков, Г.К. Райымбекова

Представлен материал по криорезистентности сперматозоидов, полученных путем микрохирургических методов забора спермы (TESA, MEZA).

Ключевые слова: криоконсервация; сперматозоид; бесплодие.

**MORPHOFUNCTIONAL INDICATORS OF SPERMATOZOONS
AT A CRYOPRESERVATION EXCRETORY STERILITY AT MEN**

A.K. Abaraliyev, G.S. Chernetsova, Ch.B. Alimov, J.K. Rayimbekov, G.K. Rayimbekova

Material on cryoresistance of the spermatozoons received by microsurgical methods of an intake of sperm (TESA, MEZA) is presented.

Keywords: cryopreservation; spermatozoon; sterility.

Введение. Одним из важнейших направлений современной медицины является лечение бесплодия, причем, если ранее обследованию и устранению причин бесплодия подвергались преимущественно женщины, то на сегодняшний день пациентами соответствующих отделений клиник все чаще становятся мужчины.

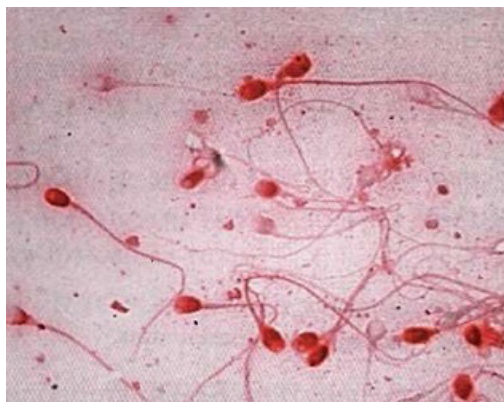
Среди многочисленных причин неспособности мужчины к оплодотворению существует экскреторное бесплодие. Этим термином называют нарушение выведения семени по семявыносящим протокам, при этом сам сперматогенез остается в норме.

Проведение процедур микрохирургических TESA, MEZA при азооспермии остается актуальным и в данное время. Определение процессов, ведущих к криорезистентности, и использование наиболее рациональной технологии обработки спермы, в процессе которой выделяются наиболее полноценные и функционально активные сперматозоиды, имеют практическое значение в лечении мужского фактора в бесплодном браке. Это также необходимое условие полноценных программ вспомогательных репродуктивных технологий [1–8].

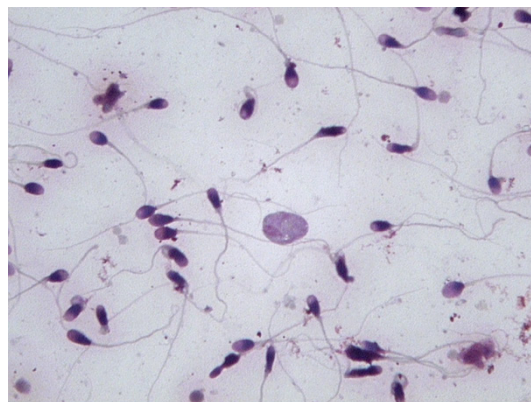
Цель исследования – изучить морфофункциональные показатели спермиев при криоконсервации и обработки спермы в программах ВРТ, полученных путем микрохирургических операций.

Материал и методы исследования. Для исследования использовали 16 образцов эякулята мужчин детородного возраста с различными нарушениями фертильности и азооспермии, полученных путем микрохирургических операций яичка и придатка. При криоконсервации использовали криопротектор на основе глицерина CryoSperm (MediCult, Дания). Замораживание проводили в стандартном режиме: инкубировали над парами азота в течение 30 минут, затем погружали в жидкий азот. Размораживали в течение 10 минут на водяной бане при температуре 34–37 °С. Обработку эякулята проводили средами SpermPreparationMedium и SupraSpermSystem (MediCult, Дания). Для обработки эякулята использовали методы флотации и центрифугирования в градиенте плотности. Функциональное состояние плазматических мембран оценивалось посредством способности мембран реагировать на гипотонические и гипертонические условия окружающей среды. Для этого проводили упрощенный HOS-test (водяной тест) и тест с растворами хлорида натрия с различной осмолярностью.

Результаты исследования. По результатам исследования, если активный исходный уровень общей подвижности сперматозоидов составлял 40–59 %, то после криоконсервации в течение одного часа после разморозки подвижность сохранялась



а)



б)

Рисунок 1 – а) суправитальная окраска сперматозоидов: отчетливо просматривается неокрашенная акросомальная часть. Окраска эозином Y.; б) суправитальная окраска сперматозоидов эозин-нигрозинном: хорошо видны акросомальная и хвостовая части (увеличение $\times 480$)

на уровне 36–52 %, соответственно (то есть 88 % от исходных 100 %). Таким образом, выживаемость клеток прямо зависела от исходного уровня подвижности. Первичная астенозооспермия после разморозки снижалась примерно в 1,5 раза. Последний протокол криозаморозки наиболее подходит для данного материала эякулята в связи с тем, что позволяет сохранить сперматозоиды без морфологических потерь.

При гипоосмотических условиях исследования сперматозоидов после криозаморозки с суправитальной окраской (150 мосм/кг раствора хлорида натрия) морфологические изменения проявляются в характерных набуханиях (swelling) хвостовой части сперматозоидов, что характеризует полноценность плазматической мембраны хвостовой части сперматозоида. В гиперосмотических условиях (510 мосм/кг) головка сперматозоида испытывает осмотическое напряжение, которое выражается в видимом набухании, что свидетельствует о полноценности мембраны и цитоплазмо-метаболической активности головки (рисунок 1).

Содержание трофобластического b-1-гликопротеина в семенной жидкости колебалось в пределах 0–21,9 нг/мл. При содержании трофобластического b-1-гликопротеина 0–7 нг/мл морфологические особенности спермиев существенно не были изменены (патологические формы спермиев составляли 16 %). Было установлено, что наибольшие показатели содержания трофобластического b-1-гликопротеина наблюдаются в образцах нативной спермы, которая не была подвергнута предварительной обработке, и составляют 11,4–21,9 нг/мл. В обработанной сперме показатели содержания трофобластического b-1-гликопротеина были ниже, они составляли 0–8 нг/мл. Активность свобод-

ного акрозина определяли по расщеплению субстрата ВАЕЕ. Общую активность акрозина определяли после разморозки спермы. Было установлено, что активность акрозина спермиев составляет от $2,6 \pm 0,7$ мкМЕ/10⁶ до $5,41 \pm 0,8$ мкМЕ/10⁶. При этом в образцах нативной спермы показатели активности акрозина были самыми низкими, а показатели в обработанных образцах – высокими. Проферментная активность акрозина увеличивается по мере снижения трофобластического b-1-гликопротеина в семенной плазме.

Таким образом, в результате проведенного исследования после криоконсервации подвижность сохранялась на уровне 19–52 %, т. е. 47–88 % от исходных 100 %. Была установлена определенная корреляция между активностью акрозина и содержанием трофобластического b-1-гликопротеина. В нативных образцах спермы содержание трофобластического b-1-гликопротеина максимальна, активность фермента акрозина минимальна. В обработанных образцах отмечается высокая активность акрозина, а содержание трофобластического b-1-гликопротеина ниже.

Проведенные исследования свидетельствуют, что сперматозоиды, полученные путем микрохирургических операций яичка и придатка (TESA, MEZA), являются морфологически целостными и пригодными для дальнейших проведенных программ ВРТ.

Литература

1. Дунаевская А.В. Активность акрозина в криоконсервированных спермиях человека / А.В. Дунаевская, Н.Н. Чуб, М.И. Крамар и др. // Проблемы репродуктологии. 2003. № 1. С. 65–70.

2. Моррелл Дж.М. Приготовление человеческих сперматозоидов в программах ВРТ / Дж.М. Моррелл // Проблемы репродуктологии. 2002. № 1. С. 24–29.
3. Киселева А.Ф. Морфофункциональные методы исследования в норме и патологии / А.Ф. Киселева, А.Я. Житников, Л.В. Кейсевич. Киев: Здоровье, 1983. С. 164.
4. Данилова Л.В. Сперматогенез и его регуляция / Л.В. Данилова. М.: Наука, 1983. С. 232.
5. Gahlay G.K., Spivastava N., Govino C.K., Gupta C.K. Primate recombinant zona pellucida protein expressed in *Escherichia coli* bind to spermatozoa // *J Reprod Immunol*. 2002. Vol. 53. S. 67–77.
6. Tournaye H. Surgical sperm recovery for intracytoplasmic sperm injection: which method is to be preferred? *Hum Reprod* 1999; 14: 71–81.
7. Girardi S.K., and Schlegel P. MESA: review of techniques, preoperative considerations and results // *J Androl*. 1996; 17:5–9.
8. Nicopoulos, J.D.M.; Gillin-Smith, C.; Almeida, P.A.; Norman-Taylor, J.; Grace, I.; Ramsay, J.W.A. Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis // *Fertil Steril* 2004; 82:691–700.
9. Van Peperstraten A., Proctor M.L., Johnson N.P., Philipson G. Techniques for surgical retrieval of sperm prior to intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) for azoospermia. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008, Issue 2. Art. No.: CD002807. DOI: 10.1002/14651858.CD002807.pub3.