

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

АХМАД МОХАММАД МОСТАФА

УДК 611.013.11:57.043

ВИКОРИСТАННЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ  
БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ РУХЛИВОЇ ФРАКЦІЇ СПЕРМІЇВ  
ЕЯКУЛЯТУ ЛЮДИНИ

22

03.00.19 - кріобіологія і кріомедицина

+13.03.24

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Харків - 1997



Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Науковий керівник: академік НАН України, доктор медичних наук, професор, лауреат Державних премій СРСР та України  
Грищенко Валентин Іванович  
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,  
керівник відділу кріобіології і системи репродукції

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор  
Цуцаєва Алла Олександрівна  
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,  
зав. відділом кріоімунології

кандидат медичних наук, доцент  
Арнольдї Едуард Костянтинівич  
Харківський державний медичний університет,  
доцент кафедри урології

Провідна установа: Інститут педіатрії, акушерства і гінекології,  
відділ реабілітації репродуктивної функції жінки,  
лабораторія штучної інсемінації  
Академії Медичних Наук України  
м.Київ

Захист відбудеться "23" грудня 1997 р. о 13<sup>30</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д50.21.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (310015, м.Харків, вул.Переяславська, 23)  
З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (310015, м.Харків, вул.Переяславська, 23)  
Автореферат розісланий "22" листопада 1997 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
доктор медичних наук, професор

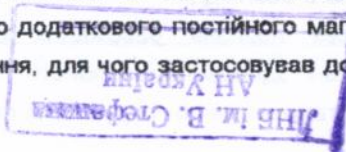
Гольцев А.М.

1  
ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. В останні два десятиріччя вагомо збільшилась кількість безплідного подружжя, в тому числі і в Україні, особливо з чоловічим фактором безпліддя (В.І.Аліпов із співавторами, 1986, Ю.С.Паращук, 1994, М.Корякін, А.Акопян, 1995). Чоловіча репродуктивна система - одна з найбільш вразливих систем організму людини. В наші дні вона зазнає сильної дії шкідливих екологічних факторів, внаслідок чого суттєво знижується концентрація сперміїв в еякуляті здорових чоловіків, зменшуються кінетичні показники гамет, збільшується вміст морфологічно аномальних клітин (L.V.Wagenknecht, 1982, A.C.Wentz, 1986, E.D.Clegg, C.S.Sakaj, P.E.Voytek, 1986, H.Yavetz, A.Mosek, L.Vogev et al, 1990). Для лікування безпліддя застосовують прогресивні методи допоміжної репродуктивної технології, а саме - штучну інсемінацію (внутрішньоматкову, внутрішньотрубну, перітонеальну) спермою чоловіка або донора, перенос яйцеклітин зі сперміями в маткові труби, інтраперітонеальний перенос сперміїв і яйцеклітин, екстракорпоральне запліднення. Для всіх цих методів важливим є виділення з еякуляту найбільш повноцінних сперміїв - фракції рухливих клітин, а також можливість короткострокового (2-5 днів) та довгострокового (місяці, роки) зберігання їх в біологічно повноцінному стані. Актуальним є пошук способів підвищення фертильності сперміїв, T.D.Carrell, W.S.Bradshaw, 1992, повідомили про ефективність використання для підвищення пенетраційної здатності сперміїв людини такого фізичного фактора як гіпотермія.

M.I.Крамар, 1990, Н.Н.Чуб, 1995, показали можливість гіпотермічного зберігання сперміїв людини в біологічно повноцінному стані при нормоспермії на протязі 24-48 годин. Разом з тим при штучній інсемінації часто виникає необхідність дворазової інсемінації через добу, тобто в цьому випадку, а також в деяких інших, необхідно збереження біологічної повноцінності сперміїв чоловіка на протязі 3-4 діб, причому останнім часом частіше за все це спермії еякулятів чоловіків з оліго-, астено- та олігоастеноспермією.

Можливість збереження запліднюючої активності сперміїв при 4 °С на протязі 4-5 діб показав в своїх дослідженнях на спермі биків М.Г.Ковальов, 1990. Він використовував дію штучного додаткового постійного магнітного поля на гамети або на середовище зберігання, для чого застосовував досить просте



обладнання з лінійних магнітів. На гаметах людини такі дослідження не проводилися.

#### Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Вибраний напрямок досліджень зв'язаний з науковими темами Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (шифр 2.2.6.6. та 2.2.6.6.6.), метою яких є вивчення впливу початкового стану, факторів низькотемпературної консервації на збереження репродуктивних клітин, а також вивчення механізму підвищення фертильності гамет при дії низьких температур в комбінації з другими фізичними і хімічними факторами.

#### Мета і задачі дослідження.

Мета дослідження - з'ясувати залежність ефективності виділення з еякуляту та гіпотермічного зберігання рухливої фракції сперміїв людини від біологічних властивостей еякуляту і дії додаткового штучного постійного магнітного поля на живільне середовище, в якому виділяли і зберігали фракцію рухливих гамет.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

-провести порівняльне вивчення ефективності виділення фракції рухливих сперміїв із еякуляту людини при порушеннях сперматогенезу та нормоспермії методом "спливання"; з'ясувати можливість підвищення її, використовуючи живільне середовище, що зазнало дії штучного постійного магнітного поля (ПМП);

-з'ясувати можливу залежність життєздатності, часу переживання та кінетичних властивостей чоловічих гамет з рухливої фракції еякуляту, які зберігались при 8 °С, від біологічних характеристик еякуляту та дії фізичних факторів - гіпотермії і ПМП;

-виявити залежність ступеню збереження акросом та активності акрозину при гіпотермії у рухливих сперміїв від вихідних біологічних властивостей еякуляту і дії ПМП на живільне середовище;

-дослідити збереження імунобіологічних властивостей сперміїв, що зберігались в умовах гіпотермії у середовищі, що зазнавало або не зазнавало дії ПМП, та з'ясувати можливість використання таких гамет в діагностиці імунологічного безпліддя.

Наукова новизна одержаних результатів. Нові наукові положення, запропоновані здобувачем особисто, такі: збереження біологічної активності чоловічих статевих клітин із рухливої фракції еякуляту при гіпотермії залежить

від стану сперматогенезу у пацієнтів. Рухливі спермії, виділені із еякуляту з нормоспермією, зберігаються в біологічно повноцінному стані при гіпотермії довше, ніж клітини, одержані при патосперміях; найменш резистентними при 8°C виявилися рухливі гамети, виділені із сперми чоловіків з олігоастеноспермією. Ці результати одержані вперше і відрізняються від відомих раніше (М.І.Крамар, 1990, Н.Н.Чуб із співавторами, 1994) тим, що автори не вивчали залежність збереження при гіпотермії біологічної повноцінності виділених із еякуляту гамет рухливої фракції від стану сперматогенезу у пацієнтів, тобто від початкових біологічних характеристик еякуляту. Новими є, одержані здобувачем особисто, результати, які свідчать про те, що виділення рухливої фракції сперміїв із еякуляту людини і подальше зберігання їх при 8°C більш ефективно в середовищі, попередньо витриманому у штучному додатковому постійному магнітному полі. Це є подальшим розвитком робіт М.Г.Ковальова, 1980-1990 рр., виконаних на сперміях великої рогатої худоби. Дані про збереження сперміями, які були виділені із еякуляту і зберігалися при гіпотермії в середовищі Ерла, на яке діяли постійним магнітним полем, імунобіологічних властивостей, одержані здобувачем вперше.

#### Практичне значення одержаних результатів.

Виділення рухливої фракції сперміїв з еякулятів по методиці, запропонованій дисертантом, тобто методом "спливання" в середовищі Ерла, попередньо витриманому в постійному магнітному полі з подальшим зберіганням при 8°C, застосовується при обслідуванні та лікуванні безплідного подружжя у відділі кріобіології системи репродукції Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України на базі 5-го спеціалізованого клінічного пологового будинку м.Харкова, що фіксується в протоколах досліджень та амбулаторних картках подружжя. Таку методику можна рекомендувати для використання в лабораторіях лікувальних закладів, в яких займаються діагностикою і лікуванням безпліддя, зокрема методами допоміжної репродуктивної технології, такими як штучна інсемінація спермою чоловіка або донора, екстракорпоральне запліднення.

Одержані здобувачем дані про залежність збереження рухливої фракції сперміїв людини в умовах гіпотермії від вихідних біологічних характеристик еякуляту рекомендується брати до уваги дослідникам та працівникам лікувальних установ, що займаються проблемами репродукції людини.

Особистий внесок здобувача. Наукові результати, що виносяться на захист, отримані дисертантом особисто. Співавтори робіт здобувача В.І.Піняєв та В.Є.Чадаєв, що займаються лікуванням безплідного подружжя, допомагали здобувачу в підборі груп пацієнтів для одержання матеріалу дослідження при різних ступенях патоспермії та при нормоспермії. Г.Г.Юрченко та М.І.Крамар допомагали здобувачеві освоїти методи дослідження сперми людини. М.Г.Ковальов та З.І.Ковальова дали в розпорядження дисертанта для проведення експериментів своє магнітне обладнання ("магнітну посудину") та рекомендації щодо підбору режиму експозиції в ньому живильного середовища. У публікаціях, що надруковані у співавторстві з указаними дослідниками, дисертанту належить ідея і постановка експериментів, статистична обробка, аналіз результатів (загальні висновки).

#### Апробація результатів дисертації.

Про результати досліджень проінформовано на I з'їзді Українського товариства кріобіології і кріомедицини (Харків, 1995), на симпозіумах з міжнародною участю "Бесплодие. Вспомогательные репродуктивные технологии" (Київ, 1995, 1997), на міжнародному симпозіумі по імунології репродукції (Київ, 1996).

#### Публікації.

По темі дисертації опубліковано 7 робіт. Головні положення дисертації викладені в 3 статтях профільного журналу, в 2-х статтях в збірниках наукових праць симпозіумів з міжнародною участю та в 2-х тезах доповідей на українських наукових форумах.

#### Структура дисертації.

Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, п'яти розділів результатів власних експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень та висновків. Повний обсяг дисертації - 114 сторінок. Дисертація містить 7 малюнків, *на с. 9* таблиць. Список використаних літературних джерел містить 159 найменувань. *на 18 сторінках.*

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали і методи дослідження.

Матеріалом дослідження були еякуляти чоловіків із безплідного подружжя. Еякуляти поділяли на 4 групи, керуючись рекомендаціями ВОЗ, 1992, згідно яких виділяють: нормоспермію, олігоспермію, астеноспермію, та олігоастеноспермію.

Для виділення фракції рухливих сперміїв застосовували метод "спливання" (E.Szerman-Joly et al., 1989). В якості живильного середовища використовували середовище Ерла.

При виборі режиму зберігання рухливої фракції сперміїв в умовах гіпотермії керувались методиками, розробленими М.І.Крамар, 1990, та Н.Н.Чуб із співавторами, 1994, у власній модифікації. Так, в якості середовища зберігання ми використовували середовище Ерла. Охолодження суспензії клітин від кімнатної температури до 8°C здійснювали в гластмасових пробірках місткістю 4 мл. Пробірки із суспензією рухливих сперміїв поміщали в скляний ексикатор, в атмосферу якого вводили 5% CO<sub>2</sub>, після чого герметично закривали та ставили в холодильник з температурою 8°C.

Для експозиції живильного середовища в додатковому постійному магнітному полі використовували магнітну "посудину" М.Г.Ковальова, 1990, яка формується з 12-ти постійних полюсових магнітів, кожен з яких має магнітну індукцію від центру до полюсів в межах від 0 до 45 мілітеста (mT). Магніти поєднуються між собою, утворюючи циліндр, який впресовується південним полюсом в дерево. Середовище Ерла в поліетиленовому флаконі об'ємом 250 мл поміщується в магнітну посудину.

При вивченні життєздатності, часу переживання сперміїв та кінетичних властивостей їх користувались оптичною мікроскопією. Для оцінки концентрації і рухливості сперміїв використовували камеру MacIer виробництва Ізраїлю. Життєздатність їх визначали методом суправітального забарвлювання, для визначення часу переживання підраховували в годинах термін зберігання рухливості сперміїв від моменту розжиження еякуляту при 37° С (Е.Н.Папус, 1991).

Для оцінки ступеню збереження акросоми гамет використовували акросомальний тест (П.Г.Морозов, 1990).

Визначення активності акрозину проводили за методичними рекомендаціями С.-Петербурзького інституту генетики і розведення сільськогосподарських тварин (Л.Г.Мороз, Н.В.Корбан, І.Ш.Шапієв, 1980) в модифікації Н.Ю.Смаглій, 1990.

При вивченні імунобіологічних властивостей гамет керувалися методичними рекомендаціями Харківського медичного інституту, 1983, та рекомендаціями ВОЗ, 1992. Застосовували якісний імунологічний тест - тест контакту сперміїв із цервікальним слизом, а також кількісні - реакцію спермоімобілізації та реакцію аглютинації.

Одержані дані оброблені статистично. Результати представлені як середнє значення при 95%-му довірному інтервалі.

### РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ АВТОРА

На меті першої серії експериментів було з'ясування залежності ефективності виділення рухливої фракції сперміїв від вихідних характеристик еякуляту і умов виділення, а також вивчення впливу гіпотермії на зберігання кінетичної активності виділених гамет і можливість підвищення її за допомогою використання живильного середовища, яке експонували в постійному магнітному полі.

Матеріалом дослідження були 17 еякулятів з нормоспермією, 19 - з олігоспермією, 23 - з астеноспермією та 21 - з олігоастеноспермією. Об'єм еякуляту був  $3,5 \pm 0,4$  мл. Одержані при цьому результати представлені в таблиці I.

Як видно з матеріалів таблиці, застосування методу "спливання" дозволило одержати суспензію рухливих сперміїв з концентрацією гамет в 1 мл значно вище, ніж вміст такої категорії гамет в еякуляті. Це пов'язано, очевидно з "відмивкою" сперміїв від окутуючих білків, тяжів слизу, так як концентрація рухливих сперміїв в одержаній після методу "спливання" суспензії вища у порівнянні з вихідним показником в еякуляті при астеноспермії та олігоастеноспермії, тобто, коли в еякулятах більший вміст слизу та його вязкість підвищена.

Беручи до уваги дані (М.Г.Ковальов, 1990) про те, що витримування в ПМП (в "магнітній посудині") живильного середовища, в якому кріоконсервується або зберігається сперма биків в умовах гіпотермії, сприяє

збільшенню тривалості збереження рухливості сперміїв, доцільним є перевірити ці дані на сперміях людини. Такий підхід до підвищення фертильності сперми дуже привабливий, бо виключає безпосередню дію на гамети. В попередніх експериментах на 19 еякулятах чоловіків з нормоспермією було встановлено, що, при виділенні рухливої фракції сперміїв із еякуляту, якщо застосувати живільне середовище, яке знаходилось в ПМП на протязі 4-18 годин, кількість виділених рухливих клітин виявляється на  $12,2 \pm 2,6\%$  більшою, що достовірно вище, ніж при використанні середовища, що не експонували в ПМП.

Базуючись на цих даних, з другої половини об'ємів еякулятів, результати виділення з яких рухливої фракції без застосування ПМП представлені в таблиці 1, ми одержували популяцію рухливих гамет в середовищі, яке експонували в ПМП. При цьому концентрація сперміїв в виділеній фракції була достовірно вищою ніж без застосування ПМП, а саме: при нормоспермії -  $84,2 \pm 3,9$  млн/мл, при олігоспермії -  $25,2 \pm 1,2$  млн/мл, при астеноспермії -  $38,4 \pm 2,5$  млн/мл ( $p$  - в усіх випадках  $< 0,05$ ). В суспензії рухливих гамет, виділених з еякуляту при олігоастеноспермії, концентрація була  $16,9 \pm 1,5$  млн/мл, в той час як при застосуванні середовища, на яке не діяли ПМП, цей показник був  $12,1 \pm 1,2$  млн/мл. В цьому випадку різниця наближалась до значущого рівня:  $0,1 > p > 0,05$ .

Виділені суспензії рухливих гамет ми зберігали при  $8^\circ\text{C}$  на протязі трьох діб, перевіряючи щоденно вміст рухливих клітин в зразках. Динаміка збереження рухливості сперміїв в процесі гіпотермічного зберігання без застосування і з застосуванням ПМП наведена в таблиці 2. Як видно з матеріалів таблиці, в тих випадках, коли використовували середовище, на яке не діяли ПМП, вже через 24 години у фракції клітин, виділених із сперми при олігоастеноспермії, частина гамет втратила рухливість ( $p < 0,05$ ), а через 72 години зниження концентрації рухливих сперміїв було статистично значущим у всіх зразках суспензії гамет.

Якщо для виділення і зберігання рухливої фракції гамет використовували живільне середовище, на яке діяли ПМП, динаміка зниження рухливості була повільнішою. Так, на протязі 48 годин в жодному зразку, за виключенням одержаних при олігоастеноспермії, не спостерігалось достовірного зниження концентрації рухливих гамет. При нормоспермії та олігоспермії і через 72 години вміст рухливих гамет достовірно не знизився.

Таблиця 1  
 Ефективність виділення рухливої фракції сперміїв із еякуляту при нормоспермії та при патосперміях  
 методом "спливання"

Концентрація сперміїв в еякуляті (млн/мл, $M \pm m$ ), стан сперматогенезу	Вміст рухливих сперміїв (% , $M \pm m$ )		Концентрація сперміїв у виділеній рухливій фракції (млн/мл, $M \pm m$ )	р при порівнянні концентрації рухливих сперміїв в еякуляті і у виділеній фракції
	%	млн/мл		
52,4±5,1 (нормоспермія)	71,5±6,8	37,5±3,9	72,0±2,7	<0,05
16,8±1,7 (олігоспермія)	60,3±4,9	10,1±1,1	20,1±0,9	<0,05
47,3±3,9 (астеноспермія)	28,7±3,1	13,3±2,2	29,5±2,1	<0,05
16,1±1,6 (олігоастеноспермія)	27,2±2,4	4,4±0,9	12,1±1,2	<0,05

Таблиця 2

Динаміка зміни концентрації рухливих спермій у суспензії, виділеної із еякуляту методом "спливання", в процесі зберігання при 8 °С в живільному середовищі Ерла

Стан сперматогенезу у пацієнтів	Концентрація (млн/мл, $M \pm m$ ) при застосуванні живільного середовища Ерла без дії ПМП				Концентрація (млн/мл, $M \pm m$ ) спермій при застосуванні живільного середовища Ерла, на яке діяли ПМП			
	до поміщення в умови гіпотермії	зберігання при 8°С			до поміщення в умови гіпотермії	зберігання при 8°С		
		24 год.	48 год.	72 год.		24 год.	48 год.	72 год.
нормоспермія	72,0±2,7	68,1±3,9	60,9±5,1	48,7±4,4*	84,2±3,9**	77,1±5,1	72,7±6,9	69,8±6,5
олігоспермія	20,0±0,9	18,2±1,4	16,4±1,3	12,6±1,2*	25,2±1,2**	21,8±2,1	19,8±1,9	18,6±2,3
астеноспермія	29,5±2,1	25,3±2,5	21,1±2,1	16,7±1,5*	38,4±2,5**	32,7±3,3	29,7±3,1	22,8±2,2*
олігоастеноспермія	12,1±1,2	8,0±0,9*	7,1±0,8*	5,9±0,6*	16,9±1,5***	14,1±1,3	10,2±1,0*	8,1±0,9*

Примітка: \*  $p < 0,05$  при порівнянні з показником до приміщення в умови гіпотермії

\*\*  $p < 0,05$  при порівнянні з показником без застосування ПМП

\*\*\*  $0,1 > p > 0,05$  при порівнянні з показником без застосування ПМП

Таким чином, в першій серії експериментів були одержані дані про те, що підвищенню фертильності сперми, зокрема підвищенню кількості рухливих гамет, сприяє використання для їх виділення з еякуляту методу "спливання" в живільному середовищі Ерла, витриманого в ПМП. Останнє сприяє також пролонгації гіпотермічного збереження одержаної суспензії рухливих гамет. Збереження рухливості гамет при гіпотермії залежить також від початкових біологічних характеристик еякуляту - при нормо- та олігоспермії воно довше, ніж при астеноспермії та олігоастеноспермії.

В другій серії експериментів вивчали життєздатність та час переживання при 37°C гамет рухливої фракції, виділеної із 27 еякулятів з нормоспермією, із 31 - з олігоспермією, із 22 - з астеноспермією та 19 - з олігоастеноспермією при зберіганні їх в умовах гіпотермії. Виявилось, що кількість живих клітин в усіх зразках суспензії на протязі 24 годин достовірно не знизилась. Через 48 годин перебування при 8°C в суспензії гамет, одержаних при астено- та олігоастеноспермії, життєздатність достовірно зменшувалась і становила  $68,5 \pm 4,2\%$  та  $62,1 \pm 3,7\%$  відповідно, а ще через добу достовірно зниження цього показника спостерігалось у всіх випадках. Середовище Ерла, експоноване в ПМП, забезпечило зберігання гамет в життєздатному стані при 8°C до кінця терміну спостереження при нормо- та олігоспермії, у клітин в суспензії, одержаної із еякулятів з астено- та олігоастеноспермією, вміст живих клітин через 72 години достовірно знизився і становив відповідно  $70,2 \pm 6,4\%$  та  $60,7 \pm 5,3\%$ .

Час переживання сперміїв при 37°C був неоднаковим у клітин рухливої фракції еякуляту при нормоспермії та порушеннях сперматогенезу навіть до того, як їх приміщали в умови гіпотермії. Так, час переживання сперміїв в суспензії, одержаної в середовищі Ерла як без обробки ПМП, так і з нею, при астено- та олігоастеноспермії був достовірно нижчим, ніж при нормоспермії, і становив відповідно: при астеноспермії  $5,9 \pm 0,6$  та  $7,8 \pm 0,9$  годин, при олігоастеноспермії  $4,8 \pm 0,5$  та  $6,5 \pm 0,8$  години, в той час як при нормоспермії час переживання гамет в середовищі без дії ПМП становив  $10,1 \pm 1,1$  години та  $12,2 \pm 1,2$  з дією на середовище Ерла ПМП, а при олігоспермії  $8,4 \pm 0,9$  та  $11,3 \pm 1,1$  години відповідно. На протязі доби при гіпотермії час переживання клітин достовірно не змінився, через 48 годин зменшився, причому найвиразніше при використанні живільного середовища, не експонованого в ПМП. В цьому випадку лише у сперміїв із еякуляту з нормоспермією він

достовірно не знизився. Якщо ж для виділення і збереження рухливої фракції гамет використовували витримане в ПМП середовище Ерла, достовірно зниження часу переживання через 48 годин при 8°C спостерігали тільки при олігоастеноспермії. Через 72 години в умовах гіпотермії в середовищі Ерла, що не експонували в магнітній "посудині", у всіх випадках констатували достовірно зниження показників часу переживання клітин при 37°C. Якщо ж застосовували ПМП, то при нормоспермії і на третю добу цей показник достовірно не знизився. Однак не зважаючи на те, що при оліго- та астеноспермії показник знизився достовірно, середня арифметична переживаємості була не менша ніж 2,4 години. Як відомо, запліднення ооцита сперміями при екстракорпоральному методі відбувається на протязі двох годин після інсемінації сперміями середовища культивування яйцеклітини.

Отже, зберігання в умовах гіпотермії при 8°C в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> забезпечує життєздатність і час переживання при 37°C сперміїв рухливої фракції еякуляту людини на рівні нативних свіжеодержаних клітин на протязі 48-72 годин при нормоспермії і на протязі 24-48 годин при патосперміях. Витримування живильного середовища перед використанням в ПМП пролонгує життєздатність сперміїв та часу переживання їх при 37°C залежно від вираження патоспермії на 24-48 годин, що має суттєве значення при лікуванні безпліддя в шлюбі методом штучної інсемінації сперміями чоловіка, а також методом екстракорпорального запліднення.

В третій серії експериментів вивчали цілісність акросом у сперміїв рухливої фракції еякуляту в процесі зберігання при гіпотермії. При дослідженні нативної сперми ми виявили, що у чоловіків репродуктивного віку як при патосперміях, так і при нормоспермії в еякуляті зустрічаються спермії з пошкодженою акросомою. При цьому наші дані (табл.3) суттєво не відрізняються від даних інших дослідників (П.Г.Морозов, 1990). Як видно з матеріалів таблиці 3, у виділеній рухливій фракції гамет також були клітини з акросомальною патологією. Дані інших дослідників про це явище в доступній літературі нами не знайдені. При оліго-, астено- і олігоастеноспермії вміст клітин з пошкодженою акросомою як в цілому еякуляті, так і в суспензії гамет рухливої фракції, був достовірно більшим, ніж при нормоспермії.

Результати, одержані при вивченні можливого впливу гіпотермії на збереження акросом у сперміїв, надані в таблиці 4. Як видно із представлених даних, якщо рухлива фракція гамет була виділена із еякуляту з

Таблиця 3

Вміст клітин з пошкодженою акросомою в цільному еякуляті і у його рухливій фракції при нормоспермії і патосперміях

Стан сперматогенезу	Цільний еякулят	p1	Рухлива фракція спермійів				
			середовище Ерла без дії ПМП	p1	середовище Ерла з дією ПМП	p1	p2
нормоспермія	16,9±1,9		7,4±0,9		6,4±0,6		>0,05
олігоспермія	25,7±2,1	<0,05	12,5±1,4	<0,05	9,1±1,1	<0,05	>0,05
астеноспермія	29,1±3,1	<0,05	15,5±1,5	<0,05	11,9±1,4	<0,05	>0,05
олігоастено-спермія	49,4±3,9	<0,05	20,2±2,4	<0,05	14,3±1,4	<0,05	>0,05

Примітка: p1-при порівнянні з нормоспермією  
p2-при порівнянні із середовищем Ерла без дії ПМП

Таблиця 4

Вплив на зберігання акросом умов виділення із еякуляту рухливої фракції спермій та зберігання її при 8°C

Стан сперматогенезу	Вміст клітин з пошкодженою акросомою у фракції рухливих спермій, (M±m), %					
	виділення та зберігання у живільному середовищі Ерла без дії ПМП			виділення та зберігання у живільному середовищі Ерла з дією ПМП		
	24 год.	48 год.	72 год.	24 год.	48 год.	72 год.
нормоспермія	8,1±0,9	9,8±1,2	14,1±1,5*	7,7±0,8	8,0±0,6	9,2±1,1
олігоспермія	13,9±1,4	15,0±1,7	23,4±2,3*	11,5±1,2	13,1±1,3	16,3±1,7
астеноспермія	16,1±1,6	19,1±2,1	29,7±3,1*	15,8±1,6	17,2±1,6	19,4±2,0*
олігоастеноспермія	23,7±2,1	29,2±2,0*	34,0±3,2*	23,1±2,4	28,9±3,0*	32,7±2,7*

Примітка: \* p<0,05 при порівнянні з показником до дії гіпотермії

олігоастеноспермією, через 48 годин перебування при 8°C акросомальна патологія у її клітин була достовірно частішою, ніж у нативних. Це спостерігали як при використанні ПМП, так і без нього. Акросомальна патологія достовірно зросла у всіх випадках після трьохдобового зберігання суспензії клітин при гіпотермії. Однак якщо використовували живільне середовище, експоноване в ПМП, при нормоспермії та олігоспермії достовірної різниці з нативними клітинами не було і через три доби.

Таким чином, акросомальна патологія більш виражена у гамет рухливої фракції еякуляту при порушеннях сперматогенезу. Акросома у сперміїв фракції, одержаної при астено- та олігоастеноспермії, зберігається гірше при гіпотермії, ніж у клітин із суспензії, виділеної при оліго- та нормоспермії. Застосування живільного середовища, витриманого в ПМП, підвищує стійкість акросом гамет, особливо із еякулятів з нормоспермією.

Серед ферментів акросоми безпосередній зв'язок з заплідненням мають акрозин та гіалуронидаза. Тому в четвертій серії експериментів ми вивчали активність акрозину у сперміїв рухливої фракції еякуляту з олігоспермією (33 еякуляти) і олігоастеноспермією (29 еякулятів). При цьому було виявлено, що динаміка зміни активності акрозину в процесі гіпотермічного зберігання відповідає в основному динаміці зменшення цілості акросом.

Для діагностики імунологічного безпліддя необхідна наявність в лабораторії сперми з високими кількісними (не менш 40 млн/мл гамет) та якісними (70% рухливих клітин) показниками. Оптимальним є використання одного донорського еякуляту на протязі трьох днів. Тому в останній, п'ятій серії дослідів, ми з'ясували, чи можна використати з цією метою, а саме для зберігання імунобіологічної активності сперміїв, гіпотермію. При цьому було встановлено, що зберігання суспензії рухливих сперміїв з еякуляту з нормоспермією при 8°C в атмосфері CO<sub>2</sub> в живільному середовищі Ерла дозволяє використати клітинну суспензію в діагностиці імунологічного безпліддя для постановки тесту контакту сперми з цервікальним слизом і реакції спермоімобілізації на протязі 48-ми, а реакції аглютинації - 72-х годин. Використання для виділення і зберігання фракції рухливих сперміїв живільного середовища, витриманого в штучному додатковому магнітному полі, подовжує термін придатності сперміїв для імунологічних методик ще на одну добу.

## ВИСНОВКИ

1. Для підвищення ефективності лікування безпліддя все ширше застосовуються допоміжні репродуктивні технології, які потребують виділення із еякуляту фертильних спермій. В даній роботі вперше з'ясована залежність ефективності виділення з еякуляту та гіпотермічного зберігання рухливої фракції спермій людини від біологічних властивостей еякуляту і дії постійного магнітного поля ( ПМП ) на живільне середовище, в якому виділяли і зберігали фракцію рухливих гамет.

2. Встановлено, що рухливі гамети, виділені з еякуляту при патосперміях, хоча й мають достатню кінетичну активність, менш стійкі при гіпотермії, ніж рухливі спермії з еякулятів із нормоспермією, що, можливо, пов'язано з більшим вмістом при патосперміях у рухливій фракції еякуляту спермій з морфо-функціональними порушеннями.

3. Динаміка зміни кінетичної активності спермій в процесі гіпотермічного збереження схожа з динамікою зміни таких показників як життєздатність, час переживання, вміст клітин з акросомальною патологією, активність акрозину.

4. Гіпотермія забезпечує при нормо-, оліго- та астеноспермії збереження в суспензії початкової концентрації рухливих спермій на протязі 48 годин. При використанні живільного середовища, на яке діяли ПМП, концентрація рухливих гамет при нормо- і олігоспермії залишалась на початковому рівні більше трьох діб, при астеноспермії достовірно понизилась лише через 72 години.

5. Акросома рухливих спермій, виділених з еякуляту при астено- та олігоастеноспермії, менш стійка при гіпотермії, ніж акросома гамет при нормо- і олігоспермії. Застосування в технології виділення і збереження при 8°C рухливої фракції клітин ПМП підвищує стійкість їх акросом при гіпотермії, особливо гамет еякулятів з нормоспермією.

6. Гіпотермія при застосуванні ПМП забезпечує збереження на протязі 72 годин імунобіологічної активності гамет із еякулятів з нормоспермією, що підтверджується в реакціях визначення антиспермальних антитіл, які використовуються в діагностиці імунологічного безпліддя.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Ахмад М.М. Влияние условий выделения подвижной фракции спермиев из эякулята человека и хранения ее при 8°C на морфо-функциональные свойства гамет // Проблемы криобиологии.- 1996.- N 4.- С.54-55.
2. Юрченко Г.Г., Ахмад М.М., Крамар М.И. Сохранность акросом у спермиев подвижной фракции эякулята человека, хранившихся в условиях гипотермии // Проблемы криобиологии.- 1997.- N 3.- С.57-59.
3. Ахмад М.М., Ковалев М.Г., Пиняев В.И., Чадаев В.Е. Влияние гипотермии и обработки среды хранения дополнительным постоянным магнитным полем на кинетические характеристики спермиев человека // Проблемы криобиологии.- 1997.- N 3.- С.48-51.
4. Ахмад М.М., Ковалева З.И. Применение постоянного магнитного поля для стимуляции подвижности нативных и хранившихся в условиях гипотермии спермиев человека // Бесплодие: Вспомогательные репродуктивные технологии. Сб. научн. трудов симпозиума с международным участием.- Киев.- 1995.- С.58-59.
5. Ахмад М.М., Ковалев М.Г., Юрченко Г.Г., Крамар М.И. Жизнеспособность и переживаемость активноподвижных спермиев в условиях гипотермического хранения // Бесплодие: Вспомогательные репродуктивные технологии. Сб. научн. трудов симпозиума с международным участием.- Киев.- 1997.- С.143-145.
6. Ахмад М.М., Ковалев М.Г., Юрченко Г.Г. Влияние постоянного магнитного поля на иммунобиологические свойства спермиев, хранившихся в условиях гипотермии // Тези доповідей 1-го з'їзду Українського товариства криобіології і криомедицини.- Харків.- 1995.- С.7-9.
7. Ahmad M.M. Prolongation of Integrity of Spermatozoa Penetrating Ability by Means of Physical Factors for Immunological Intertility Diagnostics // Abstracts International Symposium on Immunology of Reproduction.- Kyiv.- 1996.- P.107.

Ахмад М.М. Використання фізичних факторів для підвищення біологічної активності рухливої фракції сперміїв еякуляту людини.- Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.19 - кріобіологія і кріомедицина.- Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 1997.

В роботі вивчалась можливість використання гіпотермії і постійного магнітного поля ( ПМП ) з метою подовження терміну збереження рухливої фракції сперміїв еякуляту людини. З'ясована залежність результативності гіпотермічного збереження рухливих сперміїв від початкових біологічних характеристик еякуляту. Одержані дані про те, що у фракції рухливих сперміїв при патосперміях вміст клітин з морфофункціональними порушеннями вище, ніж при нормоспермії, в зв'язку з чим гіпотермічне збереження рухливих гамет менш ефективне. Показана можливість підвищення ефективності виділення та збереження при 8°C рухливої фракції гамет шляхом використання в методі "спливання" живильного середовища, витриманого в ПМП.

Ключові слова: гіпотермія, середовище виділення, патоспермії, нормоспермія, рухлива фракція сперміїв, постійне магнітне поле, безпліддя.

Ахмад М.М. Использование физических факторов для повышения биологической активности подвижной фракции спермиев эякулята человека.- Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.19 - криобиология и криомедицина.- Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 1997.

В работе изучалась возможность использования гипотермии и постоянного магнитного поля (ПМП) с целью продления срока хранения

подвижной фракции спермиев эякулята человека. Выяснена зависимость результативности гипотермического хранения подвижных спермиев от исходных биологических характеристик эякулята. Получены данные о том, что во фракции подвижных спермиев при патоспермиях содержание клеток с морфофункциональными нарушениями выше, чем при нормоспермии, в связи с чем гипотермическое хранение подвижных гамет при патоспермиях менее эффективно. Показана возможность повышения эффективности выделения и хранения при 8°C подвижной фракции гамет путем использования в методе "всплывания" питательной среды, выдержанной в ПМП.

Ключевые слова: гипотермия, среда выделения, патоспермии, нормоспермия, подвижная фракция спермиев, постоянное магнитное поле, бесплодие.

Ahmad M.M. The use of physical factors for the improvement of biological activity in the motile sperm fraction from a human ejaculate.- Manuscript.

Thesis for a candidate's degree by speciality 03.00.19 - cryobiology and cryomedicine.- Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Science of Ukraine, Kharkov, 1997.

The dissertation is devoted to study the possibility of the use of hypothermia and permanent magnetic field ( PMF ) with the purpose of storage term prolongation of the motile sperm fraction from a human ejaculate. Dependence of hypothermic motile sperm storage effect upon initial biologic ejaculate characteristics were elucidated. According to the data obtained the number of cells with morphofunctional disorders was more in cases of pathospermia than in those of normospermia. So, as the author showed in his work, hypothermial storage of motile gametes in pathospermia less effective. The possibility of more effective motile gamete fractions separation and storage at

8°C by the use of nutrient medium under PMF effect during swim-up were show.

Key Words: hypothermia, medium of selection, pathospermia, normospermia, motile sperm fraction, permanent magnetic field, infertility.



Відповідальний за випуск В.І. Грищенко

Підп. до друку 20. 11. 97 р.

Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>

1.0 ум. -друк. арк., 1.0 обл.-вид. арк. Тираж - 100. Зам. 200

---

ТОВ "Знання LTD", Харків, вул. Артема, 32

AB 39.082  
**AB 39.082**