УДК 611-013.11-003.2

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ ИЗ СПЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА

Плосконос М.В.

ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, e-mail: ploskonoz@mail.ru;

Каспийский институт морского и речного транспорта – филиал ФГБОУ ВО «ВГУВТ», Астрахань

Описаны методы выделения сперматозоидов из мужской спермы: отмывание от семенной плазмы, центрифугирование эякулята в градиенте плотности и метод «swim-up». Даётся сравнительная характеристика эффективности методов, а также описаны их недостатки. Выбор метода зависит от того, проводится выделение половых клеток для клинического использования или для исследовательских целей, а так же от характеристик эякулята и правил, предусмотренных в конкретной лаборатории.

Ключевые слова: эякулят, сперматозоиды, «swim-up», градиентное центрифугирование

COMPARISON OF THE RECOVERED SPERMATOZOA FROM HUMAN SPERM

Ploskonos M.V.

[1]Astrakhan State Medical University Health Ministry of Russian Federation, Astrakhan, e-mail: ploskonoz@mail.ru;

[2]Volga State University of Water Transport Caspian Institute of Sea and River Transport, Astrakhan

The methods of separation of sperm from the male sperm: money from the seminal plasma, semen centrifugation and density gradient method «swim-up». We give a comparative description of the effectiveness of methods and describes their shortcomings. The choice of method depends on the selection carried germ cells for clinical use or for research purposes, as well as the characteristics of the ejaculate, and the rules provided in a particular laboratory.

Keywords: ejaculate, spermatozoa, «swim-up», gradient centrifugation

Сперма или эякулят – это порция сперматозоидов и спермоплазмы, выделяющаяся из уретры во время одной эякуляции. При селекции половых клеток с целью дальнейшего их использования в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), либо при проведении научных и лабораторных исследований бывает необходимо выделение половых клеток из спермоплазмы.

Для выделения сперматозоидов из спермы существуют разные методы: отмывание от семенной плазмы, центрифугирование эякулята в градиенте плотности и метод «swim-up». Другие методы обработки спермы, например, методы фильтрации (в колонках из стекловолокна, стеклянных гранул или поперечно-сшитого декстранового геля), используются крайне редко в силу их неоправданной трудоёмкости.

Важным условием при выборе того или иного метода является сохранение жизнеспособности и кинетических параметров мужских половых клеток после их выделения, а при выделении сперматозоидов с целью их селекции для программ ВРТ необходимым является получение фракции прогрессивно подвижных форм сперматозоидов с нормальной структурой хроматина [1, 10].

Достаточно часто применяется метод отмывания, в результате которого сперму разделяют на сперматозоиды и спермоплазму центрифугированием при 1700 g, после сперматозоиды отмывают дважды физиологическим раствором, или после разведения спермы в 0,9% NaCI (1:1) отмывание выполняют центрифугированием при 400 g в течение 5 мин [5, 7].

Метод отмывания – самый простой метод выделения сперматозоидов из спермы и в процессе подготовки сперматозоидов к программам ВРТ применяется чаще всего к эякуляту хорошего качества. К недостаткам метода относят образование активных форм кислорода (АФК) в осадке клеток после центрифугирования, а так же оседание вместе с подвижными сперматозоидами потенциально токсичных клеток и мёртвых сперматозоидов, что может оказывать негативный эффект и сказываться на сохранности генетического материала жизнеспособных сперматозоидов [6, 8].

Поэтому одним из направлений оптимизации программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) является разработка методов, позволяющих с наибольшей эффективностью выделить из спермы фракцию прогрессивно подвижных сперматозоидов, используемую для инсеминации ооцитов, которая имела бы наилучшие показатели кинематики и морфологии. В связи с этим наиболее широко применяемыми

в ВРТ и в большинстве лабораторий для получения подвижной фракции используется метод всплытия «swim-up», либо фракционирование эякулята в градиенте плотности перколла (технология обработки спермы «Percoll» или «PureSperm») [1, 9].

Метод всплытия «swim-up» довольно часто используемый метод миграции сперматозоидов. Подход имитирует естественное перемещение сперматозоидов через цервикальную слизь. При этом фракция спермы располагается под фракцией культуральной среды, что позволяет прогрессивно подвижным сперматозоидам переместиться во фракцию среды. В качестве среды часто используется среда ReadySwim^{tm} («Nidacon International AB», Швеция).

Метод «swim-up» отделяет сперматозоиды от остального состава эякулята исключительно на основании их подвижности, однако не отделяет ни морфологически деформированные, ни сперматозоиды с нарушенным хроматином. Так же не удаляются бактерии и вирусы, присутствие которых и продуцируемых ими эндотоксинов или реакционноактивных соединений кислорода из клеток, мёртвых или погибающих сперматозоидов, оказывает губительное действие на функциональную полноценность хроматина, на оплодотворяющую способность и выживаемость всех сперматозоидов [4, 10].

Центрифугирование спермы в градиенте плотности позволяет отобрать подвижные сперматозоиды с нормальной морфологией. Метод основан на принципе центрифугирования спермы через градиент, образованный, двумя-тремя слоями растворов с возрастающей плотностью (масса/объём), содержащих различные концентрации частиц коллоидного кремния. Таким образом, подход основан на разделении компонентов (клеток) эякулята по их удельному весу и плотности.

При выполнении метода градиентного центрифугирования образец спермы располагается поверх градиента. В процессе центрифугирования сперматозоиды перемещаются к той позиции в градиенте, которая отвечает их собственной плотности, другими словами, к их изопикнической точке [9].

Технология центрифугирования сперматозоидов в градиенте плотности возможна с использованием в качестве коллоида «Percoll^{tm}» («KABI Pharmacia», Швеция) для исследовательских целей, а для клинического использования в качестве материала для выделения сперматозоидов из спермы применяется «PureSperm» («Nidacon International AB», Швеция).

Кроме того, в процессе градиентного центрифугирования могут быть отделены другие клетки, присутствующие в сперме, например, лейкоциты и эпителиальные клетки, так же как мёртвые и погибающие сперматозоиды, которые служат источником АФК и могут вызывать оксидативный стресс. Одновременное удаление сперматозоидов с повреждённым хроматином и источников АФК должно смягчить воздействие их высокой концентрации на образцы спермы в процессе её обработки [2, 3].

Считается, что применение перколла позволяет более полно выделить из спермы прогрессивно подвижные сперматозоиды. В то же время популяция сперматозоидов, полученная при использовании метода «swim-up», характеризуется лучшими кинематическими параметрами, а также меньшим числом нежизнеспособных и апоптотических сперматозоидов по сравнению с популяцией клеток, выделенных методами простого отмывания от семенной плазмы и непрерывного центрифугирования в градиенте плотности перколла [1].

Относительно того, какой из методов выделения фракции подвижных клеток в большей степени повышает долю морфологически нормальных сперматозоидов, нет единого мнения. Имеются указания как на преимущества использования перколла, так и «swim-up», а также равную эффективность этих методов.

Сравнительный анализ этих двух основных методов выделения прогрессивно подвижной фракции сперматозоидов показал, что метод «swim-up» более эффективен в селекции клеток с нормальным хроматином, чем градиент плотности. Более того, после обработки в градиенте «PureSperm» в некоторых случаях степень повреждения ДНК – индекс фрагментации (ИФ) – повышался. Средний ИФ в эякуляте составлял 12%, после применения «swim-up» – 5,5% [1].

Некоторые авторы считают, что наиболее эффективным для выделения из спермы фракции прогрессивно подвижных сперматозоидов и при селекции клеток с нормальной структурой хроматина, является комбинированный метод, суть которого заключается в последовательном применении центрифугирования в изотоническом 90% перколле и дальнейшего всплытия сперматозоидов из полученного осадка. Эта модификация позволяет сочетать преимущества обеих методик. Так, было показано, что при этом эффективно повышается доля сперматозоидов с нормальной структурой хроматина. Применение комбинированного метода выделения прогрессивно подвижных половых клеток позволяет получить популяцию сперматозоидов со значительно лучшими морфологическими характеристиками по

сравнению с нативным эякулятом как при нормо-, так и при патоспермии [9, 10].

Следует так же отметить, что немаловажным при выделении сперматозоидов из спермы для селекции клеток с целью дальнейшего их использования в программах ВРТ является контроль контаминации.

Способность градиента PureSperm удалять вирусы, например, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) или вирус гепатита С, имеет важное значение для предложения ВРТ супружеским парам, в которых муж инфицирован.

Применение градиента PureSperm в сочетании с методом «swim-up» при выделении сперматозоидов для ВРТ способно снижать вирусную контаминацию ниже уровня детекции и является безопасной альтернативой для зачатия ребенка у супружеских пар, в которых муж серопозитивен по ВИЧ.

В то же время отделение всех вирусов от популяции сперматозоидов может быть невозможным. Так, например, удалось идентифицировать ДНК вируса папилломы человека в сперматозоидах после обработки в градиенте перколла, т.е. сперматозоиды могут служить в качестве векторов для определенных вирусов. Однако некоторые авторы считают, что вирус папилломы человека может удаляться градиентом плотности PureSperm [1].

Анализируя данные разных исследований, проведённых как в России, так и за рубежом, можно сказать, что до настоящего времени не сложилось единого мнения какой метод лучше использовать для выделения сперматозоидов из нативного эякулята. Выбор метода зависит от того, проводится выделение половых клеток для исследовательских целей или для клинического использования, а так же от характеристик эякулята и правил, предусмотренных в конкретной лаборатории. Так, например, к недостатку методики «swim-up» следует отнести неадекватность подхода при выраженной астенозооспермии (низкой подвижности сперматозоидов). Подход градиентного центрифугирования применяется многими лабораториями, как штатный способ обработки спермы низкого качества.

Список литературы

1. Воробьёва О.А., Воскресенская А.В., Одинцов А.А. и др. Мужское бесплодие и нарушение структурной организации хроматина сперматозоидов. Существует ли связь? // Пробл. репрод. – 2005. – № 6. – С. 56–62.

2. Плосконос М.В. Значение полиаминов в репродуктивной функции мужчин // Успехи современного естествознания. – 2004. – № 11. – С. 97–98.

3. Плосконос М.В. Роль маркёров апоптоза Fas и FasL в сперматогенезе // Урология. – 2012. – № 1. – С. 77–80.

4. Плосконос М.В. Мембранная экстернализация фосфатидилсерина сперматозоидов фертильных и субфертильных мужчин // Перспективы развития науки и образования: материалы Международной научно-практической конференции. – М.: АР-Консалт, 2013. – ч. 1. – С. 73–75.

5. Плосконос М.В. Методы определения апоптоза сперматозоидов (Обзор литературы) // Клин. лаб. диаг. – 2013. – № 4. – С. 3–8.

6. Плосконос М.В. Применение эозина и йодистого пропидия для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека // Клин. лаб. диаг. – 2014. – Т. 59, № 11. – С. 22–25.

7. Плосконос М.В., Николаев А.А. Содержание свободных полиаминов в спермоплазме фертильных и субфертильных мужчин // Пробл. репрод. – 2010. – Т. 16, № 3. – С. 80–82.

8. Плосконос М.В., Николаев А.А. Апоптоз и мужская фертильность // Врач. – 2014. – № 3. – С. 23–25.

9. Gandini L., Lombardo F., Paoli D. et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage // Hum. Reprod. – 2004. – № 6. – P. 1409–1417.

10. Tomlinson M.J., Moffatt O., Manicardi G.C. et al. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception // Hum. Reprod. – 2001. – Vol. 16. – № 10. – P. 2160–2165.