

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ЗООЛОГИИ И ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ
Направление подготовки 06.04.01 Биология
Профиль «Биоресурсы и биоразнообразие»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
(МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ)
АБДУРАХМАНОВОЙ РУФИНЫ ТАХИРОВНЫ

**ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СПЕРМАТОЗОИДОВ
ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ПОДХОДА К
ДИАГНОСТИКЕ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ**

Работа завершена:

« 9 » июня 2021 г.  (Р. Т. Абдурахманова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук, доцент

« 1 » июня 2021 г.  (М. М. Сальникова)

Заведующий кафедрой

Кандидат биологических наук, доцент

« 02 » июня 2021 г.  (Р. М. Сабиров)

Казань - 2021

РЕФЕРАТ

Ключевые слова: Спермограмма, олигозооспермия, астенозооспермия, тератозооспермия, глоболозооспермия, бесплодие, методы вспомогательных репродуктивных технологий.

В XXI веке проблема бесплодия приобретает особо острый характер и затрагивает миллионы людей во всем мире. Мужской фактор бесплодия может проявляться множеством различных нарушений, вызывающих изменение числа сперматозоидов, их морфологии и функций. Для точного выбора метода искусственного оплодотворения морфологические характеристики сперматозоидов во многих случаях становятся определяющими.

Объектом исследования служил эякулят человека. Материал был получен на базе медицинского центра «Клиника Нуриевых». В исследование, по выбору оптимального красителя и влиянию дезинфицирующих средств было включено 30 образцов эякулята с заключением нормозооспермия. Для исследования морфологических параметров был взят биоматериал по случайному подбору у 30 пациентов. Анализ успешности вспомогательных репродуктивных технологий сделан по итогам андрологической лаборатории за 6 месяцев 2018 года.

Проведенные исследования показали, что окрашивание мазков эякулята человека гематоксилином Майера, является экономически выгодным, удобным и наиболее информативным методом для цитоморфологического анализа.

В результате исследований апробировано действие дезинфицирующих средств в различной концентрации: спирт этиловый, перекись водорода, лизарин, део-хлора на подвижность и морфологию сперматозоидов и выявлено, что только лизарин практически не оказывает отрицательного действия на половые клетки.

Исследования характеристик половых клеток у мужчин показали высокую частоту встречаемости (40 %) нарушения подвижности (астенозооспермия), а также сочетания её с другими аномалиями (астенотератозооспермия, олигоастенотератозооспермия). Статистический анализ результатов лечения методом ЭКО демонстрирует у пациентов с заключениями астенозооспермии положительный результат с вероятностью 4,5 %. Цитоморфологические и статистические исследования выявили сложность, а вместе с тем необходимость выделения среди тератозооспермии патологию головки, т. е. глоболозооспермии.

По статистическому анализу эффективность лечения бесплодия методом ЭКО составляет 26,9 % ($p < 0.05$) среди пациентов у которых преобладает мужской фактор при диагностике бесплодия.

Выпускная квалификационная работа состоит из 82 страниц, включает 38 рисунка и 3 таблицы. Список литературы включает 47 источников, из которых 29 - зарубежные авторы.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1 Строение мужской половой системы.....	9
1.2 Сперматогенез.....	9
1.3 Гормональная регуляция мужской репродуктивной системы.....	14
1.4 Морфология сперматозоидов в норме.....	16
1.4.1 Ультраструктура сперматозоида.....	18
1.5 Патологии сперматозоидов.....	20
1.5.1 Методы исследование эякулята.....	20
1.5.2 Морфология сперматозоидов при патологии.....	24
1.5.3 Патология генетического материала сперматозоида.....	29
1.6 Заболевания мужской половой системы.....	32
1.7 Методы вспомогательных репродуктивных технологий.....	33
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	38
2.1 Объект исследования.....	38
2.1.1 Микроскопическое исследование семенной жидкости.....	38
2.1.2 Определение подвижности сперматозоидов человека.....	38
2.1.3 Оценка морфологии сперматозоидов человека.....	39
2.2 Приготовление мазков эякулята.....	40
2.3 Методы окрашивания.....	40
2.3.1 Окраска по Папаниколау.....	40
2.3.2. Окраска "Spermac Stain".....	41
2.3.3 Окраска гематоксилином по Майеру.....	42
2.4 Исследования по влиянию центрифугирования на подвижность и морфологию сперматозоидов.....	43
2.5 Исследования по влиянию дезинфицирующих средств на подвижность и морфологию сперматозоидов.....	43
2.6. Изучение динамики успешности методов ВРТ.....	44
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	46
3.1 Исследования по выбору оптимального метода окрашивания сперматозоидов человека.....	46
3.1.1 Окраска семенной жидкости по Папаниколау.....	46

3.1.2	Окрашивание сперматозоидов диагностическим набором «Spermac Stain»	47
3.1.3.	Окраска семенной жидкости гематоксилином	48
3.1.4	Количество нормальных и аномальных сперматозоидов, окрашенных разными красителями	51
3.2	Влияние центрифугирования на процент нормальных сперматозоидов	53
3.3	Влияние дезинфицирующих средств на подвижность и морфологию сперматозоидов в эякуляте человека	54
3.3.1	Влияние перекиси водорода на подвижность сперматозоидов человека в эякуляте.....	54
3.3.2	Влияние 0,1 % део-хлора на подвижность сперматозоидов человека в эякуляте.....	55
3.3.3	Влияние 70 % спирта этилового на подвижность сперматозоидов человека в эякуляте	56
3.3.4	Влияние 2 % раствора лизарина на подвижность сперматозоидов человека в эякуляте.....	57
3.3.5	Влияние дезинфицирующих средств на морфологию сперматозоидов в эякуляте человека	58
3.4	Качественные морфологические характеристики сперматозоидов, влияющие на диагностику мужского бесплодия	59
3.5	Статистический анализ зависимости успешного оплодотворения от структурных аномалий сперматозоидов.....	68
	ВЫВОДЫ	74
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	76

ВВЕДЕНИЕ

В XXI веке проблема бесплодия приобретает особо острый характер и затрагивает миллионы людей во всем мире. К сожалению, корректной статистики по уровню бесплодных пар репродуктивного возраста нет. Одни эксперты говорят о 15 % (Долгов и др., 2006), а другие называют 17 % или даже 18 %, но очевидно, что проблема существует (Кулаков и др., 2007). Одним из возможного решения данной проблемы являются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ). Они включают процедуры и методы лечения бесплодия, а также манипуляции *in vitro* с человеческими ооцитами, спермой и эмбрионами с целью наступления беременности (Zegers-Hochschild et al., 2009). Эффективность лечения бесплодия при помощи современных репродуктивных технологий достигла в лучших центрах мира 30-40 % в расчете на одну попытку, что превосходит «эффективность» естественного зачатия (Радзинский, 2006).

Известно, что к оплодотворению яйцеклетки способны сперматозоиды, с нормальной формой,двигающиеся прямолинейно с необходимой скоростью. Следовательно, такие показатели, как концентрация, подвижность и морфология сперматозоидов являются важными показателями мужской фертильности. Исследование репродуктивной функции мужчины является актуальной задачей.

Мужской фактор бесплодия может проявляться множеством различных нарушений, вызывающих изменение числа сперматозоидов, их морфологических параметров и функций. Для точной постановки диагноза необходимо детальное исследование состава и функций спермы, подробно описанное в руководствах по практической андрологии и проведению анализов эякулята.

Качество анализов спермы в различных лабораториях может значительно различаться (Matson, 1995). Это означает, что диагностика и лечение конкретных пациентов могут зависеть от лабораторной

интерпретации исследования. Без достоверных данных анализов пациенту может быть подобрано совершенно неподходящее лечение и выбран неверный метод ВРТ. Очевидно, что при применении вспомогательных технологий необходимо убедиться в адекватности и корректности обучения персонала основным техникам работы с образцами спермы в соответствии с руководством ВОЗ.

Важнейшим критерием, на основании которого принимается решение о выборе метода лечения мужского бесплодия, является анализ спермограммы. В ежедневной практике основной проблемой проведения диагностики мужского бесплодия является отсутствие стандартов качества анализа спермограммы. Следует признать, что анализ эякулята к настоящему времени отличается от основных клинических лабораторных исследований тем фактом, что пороговое значение нормы для каждого показателя эякулята являются метод-зависимыми (Pasey, 2006).

Современная медицина располагает методами вспомогательных репродуктивных технологий, способных дать возможность бесплодной паре стать родителями даже в самых сложных случаях. В частности это экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) и его разновидность, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ) в цитоплазму. У пациентов и репродуктологов иногда возникает дилемма в выборе метода оплодотворения - провести внутриматочную инсеминацию, или ЭКО или ИКСИ. Что лучше? Организм каждого человека индивидуален, поэтому только врач на основании данных анамнеза может решить, какая технология окажется наиболее эффективной в конкретной ситуации. Морфология сперматозоидов человека связана с репродуктивной функцией, играющую важную роль, при взаимодействии гамет и является одним из методов прогноза оплодотворяющей способности мужчины.

На основании вышесказанного целью нашей работы стало цитоморфологическое исследование сперматозоидов человека для

дифференцированного подхода к диагностике мужского бесплодия. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить наиболее информативный метод окрашивания биопрепаратов спермы;
2. Определить возможность использования дезинфицирующих средств в андрологических лабораториях;
3. Провести оценку цитоморфологических аномалий сперматозоидов человека;
4. Сделать статистический анализ зависимости успешности оплодотворения от структурных аномалий сперматозоидов по итогам работы лаборатории ВРТ;

ВЫВОДЫ

1. Проведенные исследования показали, что окрашивание мазков эякулята человека гематоксилином Майера, является экономически выгодным, удобным и наиболее информативным методом для цитоморфологического анализа. Этот метод окрашивания, позволяет исключить процедуру промывки и дальнейшее центрифугирование, приводящее к повреждению сперматозоидов на $2,3 \pm 0,4 \%$ ($p < 0.05$), а также позволяет в большем количестве визуализировать морфологические аномалии.

2. В результате исследований апробировано действие дезинфицирующих средств в различной концентрации: спирт этиловый, перекись водорода, лизарин, део-хлора на подвижность и морфологию сперматозоидов и выявлено, что только лизарин практически не оказывает отрицательного действия на половые клетки. Лизарин можно рекомендовать для использования в андрологических лабораториях.

3. Исследования характеристик половых клеток у мужчин показали высокую частоту встречаемости (40 %) нарушения подвижности (астенозооспермия), а также сочетания её с другими аномалиями (астенотератозооспермия, олигоастенотератозооспермия). Статистический анализ результатов лечения методом ЭКО демонстрирует у пациентов с заключениями астенозооспермии положительный результат с вероятностью 4,5 %. Таким пациентам, вероятно, необходимо рекомендовать использовать для лечения бесплодия метод ИКСИ.

4. Цитоморфологические и статистические исследования выявили сложность, а вместе с тем необходимость выделения среди тератозооспермии патологию головки, т.е. глоболозооспермии. По нашему мнению, и по анализу научной литературы при глоболозооспермии приоритетнее метод ИКСИ.

5. По статистическому анализу эффективность лечения бесплодия методом ЭКО составляет 26,9 % ($p < 0.05$) среди пациентов у которых преобладает мужской фактор при диагностике бесплодия.