

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОБРАБОТКИ ЭЯКУЛЯТА С АСТЕНОЗООСПЕРМИЕЙ И НОРМОЗООСПЕРМИЕЙ В ГРАДИЕНТАХ ПЛОТНОСТИ И ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ФЛОТАЦИЕЙ (всплытие, swim-up)

Житникова Агата Михайловна¹, Сергеев Дмитрий Александрович¹, Паначева Евгения Александровна¹, Зорников Данила Леонидович¹, Ворошилина Екатерина Сергеевна¹, Шорикова Елена Александровна²

¹Кафедра биологии и биотехнологий

²Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России
Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Современные методы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) требуют тщательной подготовки биологического материала для достижения успешного оплодотворения. Одним из важных этапов подготовки является предварительная обработка эякулята, которая позволяет выделить пригодные для ВРТ сперматозоиды. **Цель исследования** – оценка эффективности обработки эякулята с нормозооспермией и астенозооспермией с применением сред с градиентом плотности для улучшения количественных и качественных показателей спермограммы. **Материал и методы.** Для решения поставленных задач проанализировали 2009 образцов эякулята, собранные в период с 2015 по 2025 гг в Медицинском центре «Гармония». 177 образцов соответствовали критериям нормозооспермии, 301 образец соответствовали критериям астенозооспермии. Обработку эякулята проводили методом градиентного центрифугирования с последующим всплытием. Во всех образцах оценивали количество сперматозоидов в 1 мл, долю прогрессивно подвижных сперматозоидов, долю сперматозоидов с нормальной морфологией и долю жизнеспособных сперматозоидов до и после обработки. **Результаты.** Показаны различия между исследованными группами образцов эякулята до и после обработки. Описаны основные изменения ключевых параметров эякулята при обработке в градиентах плотности. **Выводы.** Обработка эякулята, параметры которого отвечают критериям нормозооспермии и астенозооспермии, в градиентах плотности позволяет существенно улучшить ключевые показатели качества эякулята: увеличить долю прогрессивно подвижных сперматозоидов, сперматозоидов с нормальной морфологией и, как следствие, жизнеспособных сперматозоидов. Наиболее выраженные изменения показателей качества эякулята установлены для образцов с астенозооспермией. тем не менее значения, характерные для нормозооспермии, в данных образцах не были достигнуты.

Ключевые слова: эякулят, сперматозоиды, вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), астенозооспермия, нормозооспермия, центрифугирование в градиентах плотности.

THE EFFECTIVENESS OF TREATING EJACULATE WITH ASTHENOZOOSPERMIA AND NORMOZOOSPERMIA WITH MEDIA WITH A CONCENTRATION GRADIENT

Zhitnikova Agata Mikhailovna¹, Sergeev Dmitry Aleksandrovich¹, Panacheva Evgenia Aleksandrovna¹, Zornikov Danila Leonidovich¹, Voroshilina Ekaterina Sergeevna¹, Shorikova Elena Aleksandrovna²

¹Department of Biology and Biotechnology

²Department of Medical Microbiology and Clinical Laboratory Diagnostics

Ural State Medical University

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Modern methods of assisted reproductive technologies (ART), in vitro fertilization (IVF) require careful preparation of biological material to achieve successful fertilization. One of the important stages of preparation is ejaculate pretreatment, which allows to select spermatozoa suitable for ART. **The aim of the study** was to evaluate the effectiveness of ejaculate processing in normozoospermic and asthenozoospermic patients using density gradient media to improve the quantitative and qualitative parameters of the spermogram. **Material and methods.** To address the objectives, we analyzed 2009 semen samples collected between 2015 and 2025 at Harmony Medical Center. 177 samples met the criteria of normozoospermia, 301 samples met the criteria of asthenozoospermia. Semen was processed by gradient centrifugation followed by resuspension. The number of spermatozoa in 1 ml, the proportion of progressively motile spermatozoa, the proportion of spermatozoa with normal morphology and the proportion of viable spermatozoa before and after treatment were evaluated in all samples. **Results.** Differences between the studied groups of semen samples before and after treatment are shown. The main changes in key spermogram parameters during treatment with density gradient media are described. **Conclusions.** Treatment of semen, the parameters of which meet the criteria of normozoospermia and asthenozoospermia, with density gradient media allows to significantly improve the semen quality.

Keywords: semen, spermatozoa, assisted reproductive technologies (ART), asthenozoospermia, normozoospermia, density gradient media

ВВЕДЕНИЕ

Бесплодие является одной из важнейших социальных и медицинских проблем. По данным ВОЗ частота бесплодного брака составляет 10–15% от общего числа супружеских пар и не имеет тенденции к снижению [1]. При этом только в 30% бесплодие связано только с одним из супругов, вклад мужчин и женщин составляет 50/50. В результате лечения от 40 до 60% пар могут иметь собственных детей.

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) являются современным способом лечения бесплодия, к которому прибегают в случаях, когда прочие способы не привели к результату. Однако эффективность ВРТ не превышает 38,5% в расчете на перенос одного эмбриона [2, 3].

Оценка качества эякулята и его пригодность для программы ВРТ доначала протокола – это важная составляющая, позволяющая прогнозировать эффективность программы и выбрать наиболее приемлемый для данной пары вариант. Помимо стандартной спермограммы с определением количества сперматозоидов в эякуляте, их подвижности и морфологии, проводят дополнительное исследование, направленное на оценку возможности получения достаточного для программы количества сперматозоидов с высокими показателями жизнеспособности. Для этого эякулят обрабатывают по той же методике, что и в ходе протокола ВРТ, а именно с применением специальных градиентов плотности. Благодаря такой обработке сперматозоиды отделяют от семенной плазмы, клеточного дебриса, лейкоцитов, округлых клеток и дегенерирующих половых клеток, а также концентрируют наиболее подвижные и жизнеспособные.

Учитывая, что в программы ВРТ могут вступать мужчины, эякулят которых имеет значительные отклонения от нормы, эффективность такой обработки может значительно различаться, как и количество получаемых в результате высоко жизнеспособных сперматозоидов.

Наиболее пригодными для использования в программах ВРТ считают эякулят, соответствующий критериям нормозооспермии: количество сперматозоидов в 1 мл не менее 16 млн., прогрессивная подвижность не менее 32%, количество сперматозоидов с нормальной морфологией не менее 4%, количество лейкоцитов менее 1 млн/мл. Однако значительная часть образцов соответствует критериям астенозооспермии, когда снижена подвижность сперматозоидов. Ключевые вопросы, которые стоят перед репродуктологами и эмбриологами в этой ситуации – эффективна ли будет обработка и удастся ли получить достаточное количество пригодных сперматозоидов.

Цель исследования – оценка эффективности обработки эякулята с нормозооспермией и астенозооспермией с применением градиентов плотности для улучшения количественных и качественных показателей спермограммы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для решения поставленных задач проанализировали 2009 образцов эякулята, собранные в период с 2015 по 2025 гг в Медицинском центре «Гармония». 177 образцов соответствовали критериям нормозооспермии, 301 образцов соответствовали критериям астенозооспермии.

Критерии включения: проведение прекоцепционной подготовки; все обследуемые пациенты в течение последних четырех недель не получали гормональные, антибактериальные препараты.

Критерии невключения: клинические проявления инфекционно– воспалительных заболеваний УГТ, наличие ИППП; наличие у пациентов или их родственников генетических заболеваний.

Критерии исключения: отказ пациентов от участия в исследовании.

Подготовку мужчин и отбор образцов эякулята проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ по сбору эякулята для микробиологических исследований (пункт 2.2.4

Руководства ВОЗ) [1, 7]. Обязательным условием было половое воздержание в течение 3–4 дней. Сбор эякулята пациенты осуществляли путем мастурбации в стерильный контейнер после предварительного мочеиспускания и тщательного туалета наружных половых органов, с использованием мыла и стерильных салфеток.

Объем эякулята измеряли стерильной пластиковой мерной пипеткой, pH оценивали с помощью индикаторных тест–полосок производства «Экротекс», г. Санкт–Петербург. Анализ концентрации и подвижности сперматозоидов проводили с использованием сперманализатора «Биола АФС–500». Морфологию сперматозоидов оценивали в окрашенных препаратах при 1000х увеличении микроскопа на иммерсии. Для подсчета пероксидазо–положительных лейкоцитов использовали тест LeucoScreen (FertiPro, Бельгия). Интерпретацию параметров спермограммы проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ по обработке эякулята человека [7].

Все образцы были разделены на следующие категории: нормозооспермия (объем эякулята не менее 1,5 мл, концентрация сперматозоидов не менее 15 млн/мл, прогрессивная подвижность не менее 32%, количество сперматозоидов с нормальной морфологией не менее 4%, количество лейкоцитов не более 1 млн/мл), астенозооспермия (снижение прогрессивной подвижности (менее 32%).

Обработку эякулята проводили методом градиентного центрифугирования с последующим всплытием. Для этого 1 мл разжиженного эякулята наслаивали на поверхность приготовленных градиентов (1 мл 80% градиента и 1 мл 40% градиента, «SupraSperm» (ОРИДЖИО, Дания). Подготовленный образец спермы центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут, надосадочную жидкость удаляли, а осадок переносили в пробирку с 3 мл буфера для сперматозоидов SpermPrep (ОРИДЖИО, Дания), тщательно перемешивали и снова центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 минут. Последний этап проводили повторно, после чего удаляли надосадочную жидкость, оставив 0,5 мл осадка. На осадок наслаивали 0,5 мл буфера SpermPrep (ОРИДЖИО, Дания). Пробирку с осадком устанавливали под углом 45° для того, чтобы увеличить поверхность соприкосновения спермы с буфером, и помещали в термостат при температуре +37°C на 1 час. В это время происходило всплытие активных жизнеспособных сперматозоидов. После инкубации отбирали 50 мкл поверхностной жидкости (среда + всплывшие сперматозоиды) и проводили повторную оценку концентрации, подвижности сперматозоидов на сперманализаторе, оценивали жизнеспособность сперматозоидов эозин–негрозиновым методом, готовили мазки для оценки морфологии сперматозоидов.

Статистическую обработку и визуализацию данных проводили с помощью R версии 4.4.3. В качестве меры центральной тенденции при описании переменных указывали медиану со значениями 1–го и 3–го квартилей. Статистическую значимость различий между количественными показателями оценивали тестом Манна–Уитни. Все различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ключевым отличием образцов с астенозооспермией от нормы является снижение доли сперматозоидов с прогрессивной подвижностью. Анализ параметров спермограммы нативных образцов показал, что исследуемые группы имели ряд статистически значимых отличий по другим важным показателям: количеству сперматозоидов в одном миллилитре доле жизнеспособных сперматозоидов. Только доля сперматозоидов с нормальной морфологией не различалась в исследуемых группах (Таблица 1).

Далее сравнили изменения ключевых показателей спермограммы в процессе обработки. Изменения оценивали как отношение количества сперматозоидов в 1 мл, доли прогрессивно подвижных сперматозоидов, доли жизнеспособных сперматозоидов и доли сперматозоидов с нормальной морфологией после обработки к соответствующему показателю до обработки. На рисунке (Рис. 1) представлены дельты оцениваемых показателей в группах

образцов с астенозооспермией и нормозооспермией.

Таблица 1.

Параметры эякулята до обработки

Параметр	Нормозооспермия	Астенозооспермия	Достоверность различий (p)
Количество сперматозоидов в 1мл, млн. До обработки	73,8 (51,3 – 96,3)	38,0 (26,0 – 50,0)	< 0.001
Доля прогрессивно подвижных сперматозоидов, % До обработки	24,6 (17,4 – 31,9)	5,9 (3,2 – 8,7)	< 0.001
Доля жизнеспособных сперматозоидов, % До обработки	79,0 (71,0 – 87,0)	53,5 (41,0 – 66,0)	< 0.001
Доля сперматозоидов с нормальной морфологией, % До обработки	12,5 (9,0 – 16,0)	8,5 (6,0 – 11,0)	0.246

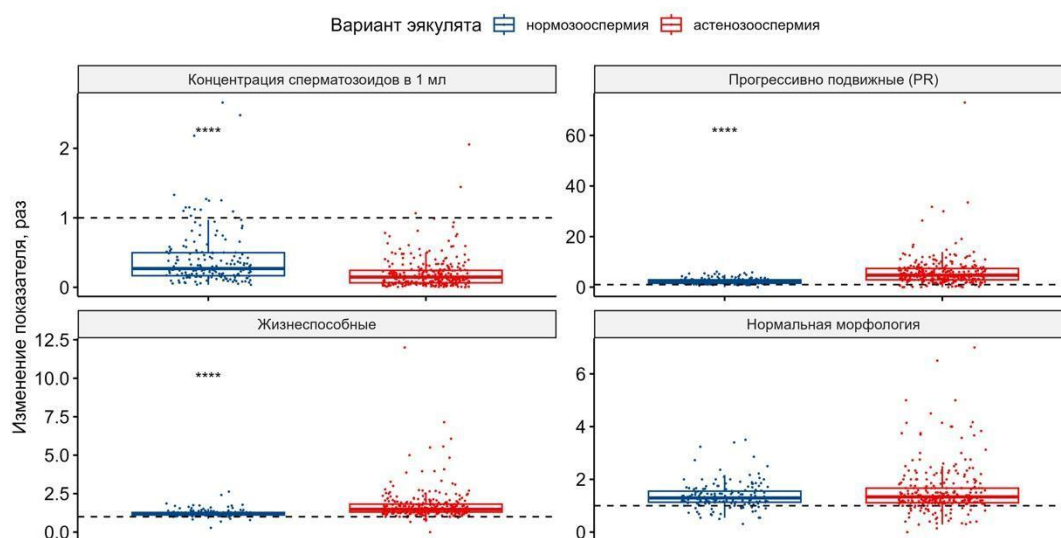


Рис. 1 «Изменение показателей эякулята с нормозооспермией и астенозооспермией до и после обработки средами с градиентом плотности»

Концентрация сперматозоидов увеличилась больше в образцах с нормозооспермией по сравнению с образцами с астенозооспермией (МЕ 0,3 (Q1– Q3 0,2– 0,5) для нормы vs МЕ 0,1 (Q1– Q3 0,1– 0,2) для астенозооспермии, $p < 0,001$).

Доля прогрессивно подвижных сперматозоидов увеличилась после обработки во всех образцах, однако для образцов с астенозооспермией увеличение было статистически более значимым (МЕ 2,2 (Q1– Q3 1,6– 2,9) для нормы vs МЕ 4,7 (Q1– Q3 2,9– 7,4) для астенозооспермии, $p < 0,001$).

Доля жизнеспособных сперматозоидов также увеличилась после обработки во всех образцах, однако для образцов с астенозооспермией увеличение было статистически более значимым (МЕ 1,2 (Q1– Q3 1,1– 1,3) для нормы vs МЕ 1,5 (Q1– Q3 1,3– 1,8) для астенозооспермии, $p < 0,001$).

Доля сперматозоидов с нормальной морфологией также увеличилась в обеих группах, однако различия статистически не значимы (МЕ 1,2 (Q1– Q3 1,1– 1,3) для нормы vs МЕ 1,5 (Q1– Q3 1,3– 1,8) для астенозооспермии, $p < 0,001$).

После обработки градиентом плотности значимые отличия по ключевым показателям качества эякулята сохранялись между группами (Рис. 2).

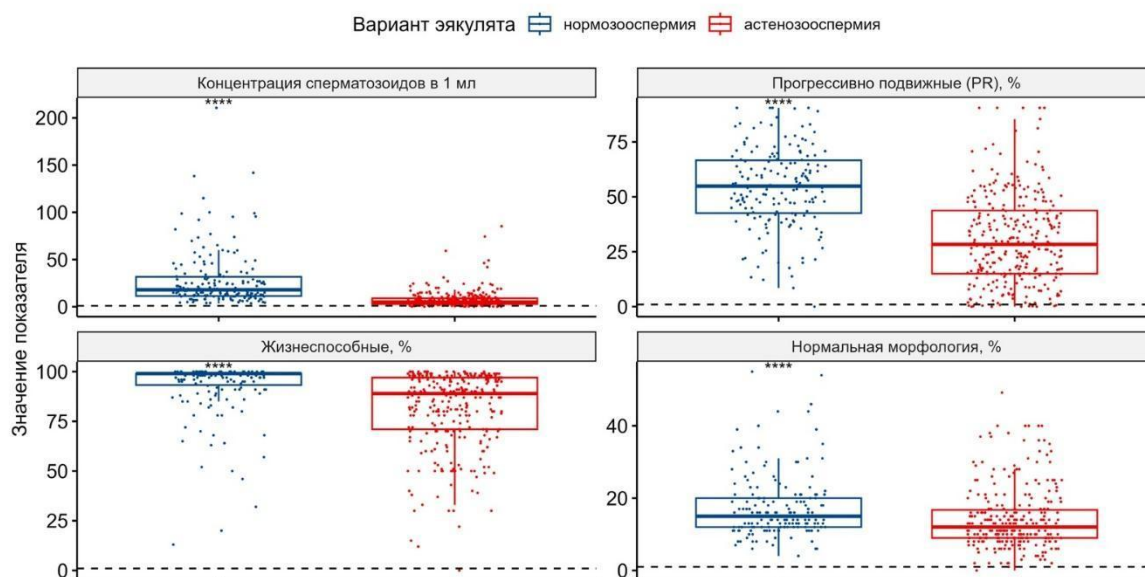


Рис. 2 «Финальные показатели»

Количество сперматозоидов в 1 мл было по-прежнему существенно выше в образцах с нормозооспермией (ME 18 млн/мл (Q1– Q3 11,5– 31,8) для нормы vs ME 5 млн/мл (Q1– Q3 3– 9) для астенозооспермии, $p < 0,001$).

Доля прогрессивно подвижных сперматозоидов отличалась почти в 2 раза в пользу образцов с нормозооспермией (ME 54,8% (Q1– Q3 42,6– 66,6) для нормы vs ME 28,4% (Q1– Q3 15– 43,7) для астенозооспермии, $p < 0,001$).

Существенно возросла доля жизнеспособных сперматозоидов в обеих группах, при этом статистически значимая разница в пользу нормозооспермии сохранилась (ME 99% (Q1– Q3 93,2– 99) для нормы vs ME 89% (Q1– Q3 71– 97) для астенозооспермии, $p < 0,001$).

Увеличилась доля сперматозоидов с нормальной морфологией в обеих группах образцов, однако при нормозооспермии данный показатель был статистически значимо выше (ME 15% (Q1– Q3 12– 20) для нормы vs ME 12% (Q1– Q3 9– 16,8) для астенозооспермии, $p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Комбинированная обработка эякулята позволяет существенно улучшить качество образцов как при нормозооспермии, так и при астенозооспермии. Наиболее значимые изменения были получены для относительных показателей качества эякулята: доли прогрессивно подвижных сперматозоидов, сперматозоидов с нормальной морфологией и, как следствие, жизнеспособных сперматозоидов. Последние являются идеальным материалом для проведения ЭКО. Примечательно, что образцы с астенозооспермией продемонстрировали больший прирост всех показателей спермограммы по сравнению с образцами с нормозооспермией. Однако, вопреки ожиданиям ключевые показатели образцов с астенозооспермией после обработки не достигли того же уровня, что и образцы с нормозооспермией. Тем не менее полученные результаты демонстрируют эффективность обработки эякулята с астенозооспермией для улучшения качества эякулята и получения достаточного количества жизнеспособных сперматозоидов в программах ВРТ.

ВЫВОДЫ

Комбинированная обработка эякулята, параметры которого отвечают критериям нормозооспермии и астенозооспермии, позволяет существенно улучшить ключевые показатели качества эякулята: увеличить долю прогрессивно подвижных сперматозоидов, сперматозоидов с нормальной морфологией и, как следствие, жизнеспособных сперматозоидов.

Наиболее выраженные изменения показателей качества эякулята установлены для образцов с астенозооспермией. тем не менее значения, характерные для нормозооспермии, не были достигнуты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World health organization: 1 in 6 people globally affected by infertility: WHO – <https://www.who.int/news/item/04-04-2023-1-in-6-people-globally-affected-by-infertility> (дата обращения: 12.12.2024).
2. The Maribor consensus: report of an expert meeting on the development of performance indicators for clinical practice in ART / ESHRE Clinic PI Working Group [et al.] // Human Reproduction Open. – 2021. – № 3. – P. hoab022.
3. ESHRE Special Interest Group Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting // ALPHA Scientists In Reproductive Medicine. Reprod. Biomed. Online. – 2011. – Vol.22, №6. – P.632–46.
4. Sperm enrichment from poor semen samples by double density gradient centrifugation in combination with swim-up for IVF cycles. / X. Dai, Y. Wang, F. Cao [et al.] // Sci Rep. – 2020. - №10. - P.2286.
5. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. / Malvezzi H, Sharma R, Agarwal A, Abuzenadah AM, Abu-Elmagd M. // Reprod Biol Endocrinol. – 2014. – №2. – P.121.
6. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. Маркеры. Часть I / Сапожкова Ж. Ю., Милованова Г. А., Пацап О. И. // Лабораторная и клиническая медицина. Фармация. – 2021. – Т. 1. – № 1. – С. 57–68.
7. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята. Пятое Издание. – 2021. – 305 с.
8. Руководство по клинической эмбриологии / под ред. Корсака В.С. // – 2-е изд. – М.; СИМК, 2019. – 250 с.
9. Элдер К. Экстракорпоральное оплодотворение / К. Элдер, Б. Дэйл // Пер. с англ. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 304с.

Сведения об авторах

Житникова А.М. – студент

Сергеев Д.А. – студент

Паначева Е.А. – врач-эмбриолог

Зорников Д.Л. – кандидат медицинских наук, доцент

Ворошилина Е.С. – доктор медицинских наук, профессор

Шорикова Е.А. – старший преподаватель

Information about the authors

Zhitnikova A.M. – Student

Sergeev D.A. – Student

Panacheva E.A. – Embryologist

Zornikov D.L. – Candidate of Science (Medical) Associate Professor

Voroshilina E.S. – Doctor of Science (Medical), Professor

Shorikova E.A. – Senior lecturer

Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

agatazhitnikova59@gmail.com

УДК: 614.441

ИТОГИ МНОГОЛЕТНЕГО МОНИТОРИНГА ВЫЯВЛЕНИЯ И РЕГИСТРАЦИИ ИСМП В МЕДИЦИНСКИХ ОРГАНИЗАЦИЯХ УРАЛА И СИБИРИ: ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА СРЕДИ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП ПАЦИЕНТОВ

Каменева Анастасия Андреевна¹, Смирнова Светлана Сергеевна^{1,2}

¹ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия

²ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), представляют собой одну из самых распространенных проблем в сфере здравоохранения, представляющую угрозу для безопасности пациентов, персонала и посетителей больниц. **Цель исследования** – оценить характеристики эпидемического процесса ИСМП у пациентов медицинских организаций Урала и Сибири на основе данных многолетнего мониторинга. **Материал и методы.** Для анализа использованы данные формы федерального статистического наблюдения № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» и дополнительные запросные Материал «Сведения о медицинских манипуляциях и контингентах пролеченных» за 2011–2024 годы, представленные управлениями Роспотребнадзора субъектов Уральского и Сибирского федеральных округов, в сравнении с среднемноголетними и среднероссийскими показателями. **Результаты.** По результатам многолетнего мониторинга с 2011–2024 гг. заболеваемость ИСМП, в медицинских организациях (МО) Уральского и Сибирского федеральных округов носила волнообразный и неравномерный характер. В структуре нозологических форм преобладали инфекции новорождённых (60,8%), инфекции в области хирургического вмешательства (14,4%) и родильниц (8,6%). Инфекции, связанные с инфузией, трансфузией и лечебными инъекциями, иммунизацией, составляли 4,1%. Наибольшее число случаев ИСМП было выявлено в акушерских