

Л. Л. Воронцова, Н. М. Партола, О. О. Міхеев, В. А. Коваленко
ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України»

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕЯКУЛЯТУ ТА ЙОГО КОМПОНЕНТІВ У ЧОЛОВІКІВ З РІЗНИМИ ВИДАМИ ПОРУШЕННЯ ФЕРТИЛЬНОСТІ

Незважаючи на досягнуті успіхи, чоловіче безпліддя і досі залишається актуальною та складною патологією для діагностики. Перспективним напрямком з вивчення патогенезу порушень чоловічої репродуктивної функції є визначення ролі активності ферментів спермоплазми.

Все вищезазначене і обумовило мету нашої роботи: дослідження активності кислої фосфатази та питомої активності γ -глутамилтранспептидази в екстракті гомогенату еякуляту у чоловіків з різними видами порушення фертильності.

Матеріали і методи. Для реалізації поставленої мети обстежено 87 чоловіків віком від 26 до 41 років, які були розділені на 5 груп. Контрольну групу склали здорові чоловіки без порушень репродуктивної системи, 2 групу – чоловіки, зі збереженою фертильністю еякуляту, 3, 4, 5 групи – чоловіки, що перебували у бездітному шлюбі. У чоловіків 2, 3, 4 та 5 груп на момент дослідження були виявлені інфекції, що передаються статевим шляхом. Усім чоловікам було проведено комплексне дослідження, що включало аналіз спермограм згідно рекомендацій ВООЗ та визначення активності кислої фосфатази та питомої активності γ -глутамилтранспептидази в екстракті гомогенату еякуляту методом постійного часу за протоколом тест-систем ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика».

Результати дослідження. В результаті аналізу спермограм виявлено 4 ступені порушення фертильності еякуляту: 1 супроводжувався збереженням фертильності з тенденцією до зниження (2 група); 2 – зниженням фертильності (3 група); 3 – значним зниженням фертильності (4 група) та 4 – відсутністю фертильних властивостей еякуляту (5 група). При вивченні активності кислої фосфатази відмічалось зниження активності ферменту у всіх досліджуваних групах, в той час як питома активність γ -глутамилтранспептидази збільшувалась тільки у чоловіків 4 та 5 групи відносно контролю.

Висновки. Таким чином, визначення стану активності кислої фосфатази та γ -глутамилтранспептидази у екстракті гомогенату еякуляту у чоловіків з порушеннями репродуктивної функції є необхідною складовою комплексного обстеження, яка може дозволити удосконалити діагностику чоловічого безпліддя та сприятиме розробленню правильної тактики та оптимальних схем лікування.

Ключові слова: чоловіче безпліддя, кисла фосфатаза, γ -глутамилтранспептидаза, екстракт гомогенату еякуляту.

Криза демографічної ситуації в світі прямопропорційно залежить від збільшення кількості безплідних подружніх пар. На сьогодні в Україні, безпліддя у шлюбі лишається однією з ключових соціальних і медичних проблем і за даними соціологічних досліджень становить близько 20% від загальної кількості сімей у різних регіонах країни [1, 2]. Протягом останніх років спостерігається тенденція до збільшення питомої ваги чоловічого фактору безпліддя, яка досягає понад 30–40%. У зв'язку з цим, питання встановлення факту чоловічого безпліддя і виявлення можливої його причини є досить актуальним і важливим. Однак, незважаючи на досягнуті успіхи, чоловіче безпліддя залишається складною патологією для діагностики [3]. Не дивлячись на широкий спектр клініко-лабораторних методів дослідження еякуляту, їхня інформативність у ряді випадків виявляється недостатньою для

встановлення причини порушень фертильності. Поряд з дослідженнями морфологічних ознак патологій репродуктивної системи зростає значущість визначення біохімічного складу і стану обміну окремих молекулярних компонентів спермальної рідини. При цьому важливе значення надається встановленню діагностичної цінності лабораторних показників, а також виявленню спрямованості порушень функцій різних залоз чоловічої репродуктивної системи [4].

Відомо, що до складу сім'яної рідини людини входить велика кількість неорганічних і органічних речовин (вуглеводів, ліпідів, білків, вільних амінокислот, гормонів, вітамінів, ферментів), від вмісту яких, певною мірою, залежить запліднююча здатність сперматозоїдів. Накопичено велику кількість матеріалу, що характеризує особливості і роль клітинного складу, органічних сполук та ферментативної активності еякуляту

в діагностиці запальних захворювань чоловічої репродуктивної системи, співвідношення та концентрація яких коливається в залежності від патологічного процесу [5, 6, 7].

Проведені окремі спроби визначення активності різних ферментів з діагностичною метою, але, урахувавши суперечливі дані, що отримані різними дослідниками, ефективно діагностичне використання визначення активності ферментів надто сумнівне без додаткових уточнюючих досліджень [8–14]. Таким чином, не дивлячись на наявність чисельної інформації у цій галузі, дослідження часто обмежені вивченням окремих білків або ферментів незалежно та без урахування виду порушення фертильності еякуляту. Таке становище зумовило проведення нами аналізу вмісту гідролаз та трансфераз з метою встановлення зв'язку з порушенням сперматогенезу у чоловіків за умов безпліддя у шлюбі.

Мета роботи дослідження активності кислої фосфатази та питомої активності γ -глутамилтранспептидази в екстракті гомогенату еякуляту у чоловіків з різними видами порушення фертильності.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведено у 87 чоловіків у віці від 20 до 45 років, які були розділені на 5 груп. Першу (контрольну) групу склали 16 здорових чоловіків без порушень репродуктивної системи, які мали 1 – 2 дітей у віці від 1 до 5 років. До другої групи (групи порівняння) увійшли 26 чоловіків зі збереженою фертильністю, які мали дітей у віці від 1 до 5 років та на момент дослідження у них були виявлені інфекції, що передаються статевим шляхом (ІПСШ). Третю (19 чоловік), четверту (16 чоловік) та п'яту (10 чоловік) групи склали чоловіки з різними видами порушення фертильності, які перебували у бездітному шлюбі від 1 до 15 років та мали на момент дослідження ІПСШ. Наявність ІПСШ в усіх чоловіків підтверджено методом полімеразної ланцюгової реакції, лікування яких, за різними причинами, не проводилось.

Усім чоловікам було проведено комплексне дослідження, що включало аналіз спермограми за рекомендаціями ВООЗ [15] та визначення ферментативної активності спермоплазми.

Велика увага приділялась підготовці, яка заключалась у виконанні зазначених умов: терміну статевого утримання (від 3 до 7 днів), відмова від алкоголю, надмірного паління та деяких лікарських препаратів, процедур з перегріванням організму (сауни, бані), фізичних і психічних навантажень, масажу простати та ін. Досліджуваного детально інструктували за яких умов можливе повноцінне одержання матеріалу. Дослідження еякуляту включало: вивчення фізичних властивостей, мікроскопічне дослідження

нативних препаратів з вивченням особливостей кінезисграм, підрахуванням кількості сперматозоїдів в 1 мл та у всьому об'ємі еякуляту та мікроскопічне дослідження пофарбованих препаратів.

Активність ферментів (кислої фосфатази та γ -глутамилтранспептидази) визначали методом постійного часу за протоколом тест-систем ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика» в нашій модифікації, згідно якій сироватка крові була замінена на екстракт гомогенату еякуляту (патент подано до Укрмедпатентінформ).

Для отримання надосадової рідини (екстракту гомогенату) еякуляту проводилось його заморожування (при температурі мінус 25°C) та розморожування при кімнатній температурі, а потім центрифугування протягом 30 хв при 5000 G.

При вивченні активності кислої фосфатази (КФ) використовували набір для дослідження лужної фосфатази, в якому лужний буфер був замінений на 0,1 М цитратний буфер (рН 5,0).

Результати дослідження активності γ -глутамилтранспептидази (γ -ГГТ) представлені у вигляді питомої активності γ -ГГТ (нкат/мл) на одиницю підрахованих сперматозоїдів (млн/мл), тобто нкат/млн сперматозоїдів.

Статистичну обробку отриманих цифрових результатів проводили за допомогою програми STATISTICA (StatSoft Statistica v.6.0.) з використанням тесту Вальда-Волковітца. Різниця вважалася достовірною при досягнутому рівні значимості $p < 0,05$. Дані, що аналізувалися представлені як медіана (Me) і межквартильний розмах (RQ), який представляє собою різницю між значеннями 75-го і 25-го процентілей ($RQ = 75\% UQ - 25\% LQ$), де UQ – верхній квартиль; LQ – нижній квартиль.

Результати дослідження та обговорення

У результаті аналізу спермограм чоловіків 1 (контрольної) групи встановлено, що відхилень від показників норм, рекомендованих ВООЗ не було виявлено (табл. 1).

У чоловіків 2 групи, хоча й були виявлені зміни окремих показників відносно контролю, однак, на фертильність еякуляту це не вплинуло. При аналізі показників спермограми чоловіків 3 групи були відмічені помірні гіпокінезис та астенозооспермія, незначний дискінезис, не різко виражена тератозооспермія, що, вочевидь, сприяє зниженню фертильності еякуляту у чоловіків даної групи.

У чоловіків 4 групи були виявлені значні гіпокінезис, астенозооспермія, дискінезис, різко виражена тератозооспермія, що свідчить про значне зниження фертильності еякуляту. У чоловіків 5 групи зовсім відсутня будь-яка рухливість сперматозоїдів (всі вони представлені нерухомими формами), різко знижені загальна

кількість, концентрація та процент морфологічно нормальних форм сперматозоїдів, що свідчить про олігоастенотератозоспермію, та, вочевидь, сприяє відсутності фертильних властивостей еякуляту у цих чоловіків.

При дослідженні активності КФ відзначалося зниження активності ферменту у чоловіків 2, 3, 4 та 5 групи на 62, 68, 77 та 83 % відносно показників контрольної групи відповідно (табл. 2).

При дослідженні питомої активності γ -ГГТ у чоловіків 2 та 3 групи статистично значущих відмінностей відносно контрольної групи виявлено

не було, в той час як у чоловіків 4 та 5 групи відзначалося збільшення на 336% (в 4 рази) та на 8176% (в 82 рази) відносно показників контрольної групи відповідно.

Ураховуючи, що КФ є ізоферментом, який міститься не тільки у сперматозоїдах (у складі акросоми), але й є компонентом простосом секрету передміхурової залози [16], зниження її активності можливо було пов'язано як зі зниженням якості секрету простати так і зі зниженням загальної кількості сперматозоїдів, що, в свою чергу, дозволяє використовувати даний по-

Таблиця 1

**Основні показники спермограми у чоловіків
з різними видами порушення фертильності Me (75% Q – 25% Q = RQ)**

Показник, одиниці вимірювання	1 група (n=16)	2 група (n=26)	3 група (n=19)	4 група (n=16)	5 група (n=10)
Активнорухомі сперматозоїди, %	48 (60–31=29)	36 (59–28=31)	24* (42–3=39)	16* (27–6=21)	0 (0–0=0)
Малорухомі сперматозоїди, %	42 (60–30=30)	50 (60–30=30)	52 (64–36=28)	50 (58–7=51)	0 (0–0=0)
Дискінезис, %	0 (0–0=0)	0* (3–0=3)	4*, ** (9–0=9)	5*, ** (16–0=16)	0 (0–0=0)
Нерухомі сперматозоїди, %	10 (12–8=4)	13* (22–7=15)	16* (46–10=36)	24 (80–16=64)	100*, ** (100–100=0)
Концентрація сперматозоїдів, ($\times 10^6$ /мл)	110 (174–66=108)	79 (164–53=111)	56* (105,0–21,5=83,5)	41* (89–0,5=78,5)	14 (21,5–4,5=17)
Загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті, ($\times 10^6$)	328 (456–231=225)	315 (720–203=517)	167,3* (350,0–71,4=278,6)	184*, ** (409–42=367)	54*, ** (91–17=74)
Нормальні форми сперматозоїдів, %	70 (84–64=20)	72 (84–62=22)	59** (72–38=34)	51 (65–19=46)	3*, ** (8–1=7)
Патологічні форми сперматозоїдів, %	30 (36–16=20)	28 (38–16=22)	41*, ** (62–28=34)	49*, ** (81–35=46)	97*, ** (99–92=7)

Примітки: * – статистично значуща різниця ($p < 0,05$) відносно контрольної групи;

** – статистично значуща різниця ($p < 0,05$) відносно 2 групи

Таблиця 2

**Активність кислої фосфатази та питома активність
 γ -глутамілтранспептидази в екстракті гомогенату еякуляту
у чоловіків з різними видами порушення фертильності
Me (75% Q – 25% Q = RQ)**

Досліджувані групи	γ -глутамілтранспептидаза (нкат/млн сперматозоїдів)	Кисла фосфатаза (мккат/л)
1 група (n=16)	0,125 (0,13–0,123=0,007)	302,76 (416,16–237,16=179)
2 група (n=26)	0,135 (0,218–0,113=0,105)	114* (120–108=12)
3 група (n=19)	0,124 (0,210–0,095=0,115)	96* (105–91=14)
4 група (n=16)	0,545*, ** (1,965–0,363=1,602)	69,5*, ** (79,5–63=16,5)
5 група (n=10)	10,345*, ** (19,2–8,9=10,3)	49,5*, ** (62–35=27)

Примітки: * – статистично значуща різниця ($p < 0,05$) відносно контрольної групи;

** – статистично значуща різниця ($p < 0,05$) відносно 2 групи.

казник в якості інтегрального критерію оцінки фертильних властивостей еякуляту.

Відомо, що наявність вільної γ -ГГТ може вказувати на розвиток деструктивних процесів в організмі, в тому числі, і в клітинах еякуляту [17].

При аналізі літературних даних [7] по вивченню активності γ -ГГТ у спермоплазмі при порівнянні груп здорових і субфертильних чоловіків з хронічними запальними захворюваннями репродуктивної системи дослідниками не було виявлено достовірних відмінностей, саме тому, наше представлення результатів дало можливість виявити зміни активності даного ферменту в екстракті гомогенату еякуляту між контрольною та дослідними групами.

Таким чином, підвищення γ -ГГТ (як мембранного ферменту) у безплідних чоловіків вочевидь пов'язано з тим, що частка мембран у надосадовій рідині зменшується прямопорційно зі зниженням кількості сперматозоїдів (тобто, для оцінки фертильності еякуляту за допомогою визначення питомої активності

ферменту, достатньо знати тільки загальну кількість сперматозоїдів в еякуляті).

Висновки

1. Приготування екстракту гомогенату еякуляту уніфікує процеси дослідження якості сперматозоїдів, простасом та компонентів у складі спермоплазми.

2. Загальна активність КФ у екстракті гомогенату еякуляту дозволяє виділити групи серед чоловіків з різними видами порушення фертильності, в той час як визначення γ -ГГТ – виявляти наявність деструктивних процесів у клітинах еякуляту.

3. Визначення стану активності КФ та γ -ГГТ у екстракті гомогенату еякуляту у чоловіків з порушеннями репродуктивної функції є необхідною складовою комплексного обстеження, яка може дозволити удосконалити діагностику чоловічого безпліддя та сприятиме розробленню правильної тактики та оптимальних схем лікування.

Список літератури

1. Поворознюк М. В. Поширеність та основні причини безпліддя у чоловіків / М. В. Поворознюк // Медицинские аспекты здоровья мужчины. – 2012. – № 3 (5). – С. 62–73.
2. Яцків О. Причини і форми чоловічого непліддя та методи діагностики еякуляту як основного показника чоловічого здоров'я / О. Яцків, А. Тарновська // Вісник Львівського університету. – 2012. – № 60. – С. 4–20.
3. Андрологические аспекты бездетного брака / В. А. Божедомов, И. М. Рохликов, А. А. Третьяков [и др.] // Медицинский совет. – 2013. – № 8(1). – С. 13–17.
4. Исследование активности ряда гидролаз, участвующих в распаде углеводсодержащих биополимеров спермальной плазмы мужчин / Н. Ш. Порулава, Ю. В. Хобта, П. Н. Шараев [и др.] // Лабораторная наука – практике: первое десятилетие XXI века: научн.-практ. конф., октябрь 2010 г.: тезисы докл. – Москва, 2010. – С. 9.
5. Бурназян Р. А. Биохимические показатели спермы при хронических воспалительных заболеваниях придаточных половых желез / Р. А. Бурназян, М. Н. Оганесян, Г. Е. Бурштейн // Урол. и нефрол. – 1992. – № 4 (6). – С. 27–30.
6. Евдокимов В. В. Белковые маркеры фертильности / В. В. Евдокимов, В. И. Ерасова, Е. В. Орлова // Андрология и генитальная хирургия. – 2004. – № 4. – С. 30–32.
7. Луцкий Д. Л. Исследование эякулята и его компонентов в диагностике воспалительных заболеваний мужской репродуктивной системы: ферменты, простасомы (обзор литературы) / Д. Л. Луцкий, Р. М. Махмудов, А. М. Луцкая // Проблемы репродукции. – 2011. – № 3. – С. 82–84.
8. Герасимов А. М. Зависимость подвижности сперматозоидов от биохимических показателей эякулята / А. М. Герасимов, Д. М. Полумисков // Пробл. репродукции. – 2003. – № 4. – С. 79–81.
9. Липатова Н. А. Белковые маркеры спермоплазмы в лабораторной диагностике бесплодия при воспалительных и невоспалительных заболеваниях мужской репродуктивной системы / Н. А. Липатова, С. С. Раков, В. Т. Морозова // Клини. лаб. диагностика – 1997. – № 5. – С. 40–41.
10. Оценка активности некоторых гидролаз в спермальной плазме у мужчин с бесплодием / П. Н. Шараев, Н. Ш. Порулава, Ю. В. Хобта [и др.] // Вятский медицинский вестник. – 2007. – № 4. – С. 75.
11. Бойко О. В. Прогностические критерии иммунного статуса больных хроническим простатитом, основанные на реакции преципитации / О. В. Бойко, А. А. Николаев // Проблемы репродукции. – 2009. – № 5. – С. 42–43.
12. Дунаевская А. В. Активность акрозина в криоконсервированных спермиях человека / А. В. Дунаевская, Н. Н. Чуб, М. И. Крамар, В. Л. Родионова // Проблемы репродуктологии. – 2003. – № 1. – С. 65–70.
13. Primate recombinant zona pellucida protein expressed in *Escherichia coli* bind to spermatozoa / G.K. Gahlay, N. Spivastava, C.K. Govino [et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2002. – Vol. 53 – P. 67–77.
14. Phosphatidic acid (PA)-preferring phospholipase A1 regulates mitochondrial dynamics / T. Baba, Y. Kashivagi, N. Arimitsu [et al.] // J. Biol. Chem. – 2014. – Vol. 289 (16). – P. 67–77.
15. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction (4th ed.). New York: Cambridge University Press Publ., 1999. 128 p.
16. Быков В. Л. Простасомы и их значение в репродукции человека (обзор литературы) / В. Е. Балан, З. К. Гаджиева, С. А. Великая [и др.] // Проблемы репродукции. – 2002. – Т. 8, № 2. – С. 48–58.
17. Ruz A. Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility / A. Ruz, A. Pilatz, F. Wagenlehner // World J. Urol. – 2012. – № 30 (1). – P. 23–30.

Л. Л. Воронцова, Н. Н. Партола, А. А. Михеев, В. А. Коваленко
 ГЗ «Запорожская медицинская академия последипломного образования МЗ Украины»

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЯКУЛЯТА И ЕГО КОМПОНЕНТОВ У МУЖЧИН С РАЗНЫМИ ВИДАМИ НАРУШЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ

Несмотря на достигнутые успехи, мужское бесплодие до сих пор остается актуальной и сложной патологией для диагностики. Перспективным направлением изучения патогенеза нарушений мужской репродуктивной функции является определение роли активности ферментов спермоплазмы.

Все вышесказанное и обусловило цель нашей работы: исследование активности кислой фосфатазы и удельной активности γ -глутамилтранспептидазы в экстракте гомогената эякулята у мужчин с различными видами нарушения фертильности.

Материалы и методы. Для реализации поставленной цели обследовано 87 мужчин в возрасте от 26 до 41 года, которые были разделены на 5 групп. Контрольную группу составили здоровые мужчины без нарушений репродуктивной системы, 2 группу – мужчины с сохраненной фертильностью эякулята, 3, 4, 5 группу – мужчины, которые находились в бездетном браке. У мужчин 2, 3, 4 и 5 групп на момент исследования были выявлены инфекции, передающиеся половым путем. Всем мужчинам было проведено комплексное исследование, включавшее анализ спермограмм согласно рекомендациям ВОЗ и определение активности кислой фосфатазы и удельной активности γ -глутамилтранспептидазы в экстракте гомогената эякулята методом постоянного времени по протоколу тест-систем ООО НПП «Филисит-Диагностика».

Результаты исследования. В результате анализа спермограмм выявлено 4 степени нарушения фертильности эякулята: 1 сопровождалась сохранением фертильности с тенденцией к снижению (2 группа); 2 – снижением фертильности (3 группа); 3 – значительным снижением фертильности (4 группа) и 4 – отсутствием фертильных свойств эякулята (5 группа). При изучении активности кислой фосфатазы отмечалось снижение активности фермента во всех исследуемых группах, в то время как удельная активность γ -глутамилтранспептидазы увеличивалась только у мужчин 4 и 5 группы относительно контроля.

Выводы. Таким образом, определение состояния активности кислой фосфатазы и γ -глутамилтранспептидазы в экстракте гомогената эякулята у мужчин с нарушениями репродуктивной функции является необходимой составляющей комплексного обследования, которая может позволить усовершенствовать диагностику мужского бесплодия и способствовать разработке правильной тактики и оптимальных схем лечения.

Ключевые слова: мужское бесплодие, кислая фосфатаза, γ -глутамилтранспептидаза, экстракт гомогената эякулята.

L. L. Vorontsova, N. M. Partola, O. O. Mikheev, V. A. Kovalenko
 SI «Zaporizhzhia Medical Academy of Postgraduate Education of Ministry of Health of Ukraine»

EXAMINATION OF THE EJACULATE AND ITS COMPONENTS AT MEN WITH DIFFERENT TYPES OF FERTILITY DISORDERS

Despite progress achieved, the male infertility is remains a relevant and challenging pathology for diagnosis. A promising direction of investigation of the pathogenesis of disorders of male reproductive function is defining the role of enzymes activity.

All of the above and have determined the purpose of our work: a study of the acid phosphatase activity and specific activity of γ -glutamyltranspeptidase in the extract of homogenate of ejaculate in men with different types of fertility disorders.

Materials and methods. To reach this goal, we examined 87 men aged 26 to 41 years, who were divided into 5 groups. The control group was consisted of healthy men without violations of the reproductive system, the second group – of men, with the stored ejaculate fertility, 3, 4, 5 the group of men from a childless marriage. In men 2, 3, 4 and 5 groups at the time of the study were identified infections sexually transmitted. A comprehensive study which included analysis of spermogram according to WHO recommendations and determine the activity of acid phosphatase and specific activity of γ -glutamyltranspeptidase in the extract of homogenate of ejaculate by the method of continuous-time according to Protocol test

systems “Phyllisit-Diagnosis” was conducted for all men.

Results. As a result of spermograms in the studied groups of men were identified 4 levels of violation the ejaculate fertility: 1 was accompanied by the preservation of fertility with a tendency to its decrease (group 2); 2 – reduced fertility (group 3); 3 – significant reduced fertility (group 4) and 4 – lack of fertile properties of the ejaculate (group 5). In the study of the activity of acid phosphatase was observed the decrease of enzyme activity in all studied groups, while the specific activity of γ -glutamyltranspeptidase was increased only in men, 4 and 5 of the group relative to the control.

Conclusions. Thus, the determination of activity of acid phosphatase and γ -glutamyltranspeptidase in the extract of homogenate of ejaculate in men with reproductive disorders is a necessary component of the comprehensive examination, which may allow to improve the diagnostics of male infertility and to promote the development of the right tactics and optimal treatment regimens.

Keywords: male infertility, acid phosphatase, γ -glutamyltranspeptidase, an extract of homogenate of ejaculate.