

М.Л. Панасовський

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.1.58-61>



Харківський Національний медичний університет
Харківський обласний клінічний центр урології та нефрології,
м. Харків, Україна

УДК 612.616:57.086.13

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТЕСТИКУЛЯРНИХ ТА ЕПІДИДИМАЛЬНИХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЧОЛОВІКІВ З АЗООСПЕРМІЄЮ

Надійшла: 24.01.2020

Прийнята: 03.03.2020

Panasovskiy M.L.   Morphological features of testicular and epididymal spermatozoa obtained from azoospermic men.

Kharkiv National Medical University; Kharkiv Regional Clinical Center of Urology and Nephrology, Kharkiv, Ukraine.


ABSTRACT. Background. Studying of morphological features of spermatozoa obtained from men with azoospermia is due to the high rate of infertile marriages with a male factor. It is extremely important to estimate spermatozoa morphological characteristics, which can be a predictor of their fertilizing ability and therefore improve assisted reproductive technology (ART) results. **Objective.** The aim of the study was to assess the morphological characteristics of spermatozoa obtained during surgical inventions in patients with azoospermia. **Methods.** Evaluation of sperm morphology was performed using light microscopy. Statistic methods was used for data processing. **Results.** Morphological characteristics of spermatozoa obtained from patients with non-obstructive azoospermia were characterized by a higher rate of mixed pathology (head, neck and tail) then morphology of spermatozoa from men with obstructive azoospermia and normozoospermia ($25.9 \pm 1.38\%$ vs $22.8 \pm 2.44\%$ and $34.6 \pm 4.21\%$, respectively). **Conclusion.** The obtained morphology data of spermatozoa from men with obstructive and non-obstructive azoospermia will allow us to introduce an algorithm for assessing sperm quality for patients undergoing ART.


Key words: sperm, infertility, obstructive azoospermia, non-obstructive azoospermia, morphological characteristics.

Citation:

Panasovskiy ML. [Morphological features of testicular and epididymal spermatozoa obtained from azoospermic men]. *Morphologia*. 2020;14(1):58-61. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.1.58-61>

 0000-0001-7152-0204

 panas26031973@gmail.com

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

Вступ

В Україні протягом останніх років відзначається ріст кількості безплідних шлюбів, в яких чоловічий фактор становить близько 50% [1].

До найбільш важких форм чоловічого безпліддя відноситься азооспермія – відсутність сперматозоїдів в еякуляті. Виділяють обструктивну та необструктивну азооспермію [2].

Ефективним способом лікування безпліддя при обох формах азооспермії є хірургічне вилучення сперматозоїдів з їх подальшим кріоконсервуванням та проведення допоміжних репродуктивних технологій з мікроін'єкцією селективно

відібраного сперматозоїда в ооплазму ооцита [3]. Проте, в літературі є повідомлення про те, що клітини, отримані при аспірації чи екстракції тестикулярної тканини чи придатку яєчка можуть мати порушення будови, оскільки вони не закінчили епідидимальне дозрівання та можуть негативно впливати на морфокінетичні характеристики ембріонів *in vitro* [4, 5].

Мета

Порівняння морфологічних характеристик сперматозоїдів, отриманих хірургічно у пацієнтів з обструктивною та необструктивною азооспермією.

Матеріали та методи

Робота була проведена на базі Харківського обласного клінічного центру урології та нефрології, відділення андрології. З метою оцінки морфологічних характеристик сперматозоїдів у дослідження було включено 140 пацієнтів чоловічої статі з діагнозом азооспермія. Групу 1 склали 42 зразка, відібраних у чоловіків з обструктивною азооспермією, групу 2 – 23 біоптата, отриманих у чоловіків з необструктивною азооспермією. Групу 3 склали репродуктивні клітини, виділені з еякуляту пацієнтів з нормозоспермією (n=30).

Під час проведення хірургічної ревізії яєчка та придатка яєчка проводили аспірацію сперматозоїдів. Для морфологічної оцінки сперматозоїди фарбували еозин-нігрозином. Для цього на предметне скло наносили 5 мкл суспензії сперматозоїдів до якого додавали 10 мкл 5% розчину еозин-нігрозину («Магарог», Іспанія). Оцінку препаратів здійснювали при $\times 1000$ із застосуванням масляної імерсії на мікроскопі Olympus IX 71 («Olympus», Японія) Сперматозоїди оцінювали за критеріями ВООЗ [6]. Сперматозоїд вважали нормальним, якщо його головка, шийка, середня частина і хвіст відповідали наступним критеріям: головка сперматозоїда овальної форми, відношення довжини до ширини від 1,50 до 1,75; акросома окреслена чітко та складає 40 - 70% площі головки; середня частина (шийка) – становить 1,5 довжини головки і прикріплюється до неї уздовж її вісі; хвіст сперматозоїда прямий, однакової товщини, не закручений. Сперматозоїд вважали патологічним, якщо його головка, шийка або хвіст мали наступні порушення: дефекти головки: великі, маленькі, конічні, грушоподібні, круглі і аморфні, головки з вакуолями (>20% площі головки заповнена незабарвленими вакуолями), головки з маленькою акросомною областю (<40% площі головки) і з подвійними го-

ловками або будь-яка їх комбінація; дефекти шийки: «схилена» (шийка і хвіст утворюють кут більш 90° до довгої вісі головки), асиметричне прикріплення середньої частини до головки, потовщена або нерівномірна середня частина, патологічно тонка середня частина або будь-яка їх комбінація; дефекти хвоста: короткі, множинні, у вигляді шпильки, зламані, похилі (кут більше 90°), хвости нерівномірної товщини, закручені або будь-яка їх комбінація. До змішаної патології відносили сперматозоїди з наявністю більш, ніж двох дефектів. Усі дослідження виконані з дотриманням правил біомедицинської етики. На проведення досліджень було отримано письмову, вільну та інформовану згоду пацієнтів. Для статистичної обробки результатів використовували програму Statistica 6,0. При порівнянні двох вибірок застосовували U-критерій Манна-Уїтні при рівні значущості $p=0,05$.

Результати та їх обговорення

Серед 140 пацієнтів з діагнозом азооспермія у 55 чоловіків виявилася обструктивна, а у 85 – необструктивна форма.

Сперматозоїди було вилучено під час формування вазо-епідіміо анастомоза у 45 (81,8%) пацієнтів із обструктивною азооспермією. В той час, як у 85 пацієнтів із необструктивною азооспермією, після резекції яєчка, сперматозоїди було вилучено лише у 23 (27,1%).

Морфологічний аналіз препаратів виявив, що частота аномалій головки сперматозоїда складала $20,64 \pm 0,93$, $19,3 \pm 2,45$ та $(20,61 \pm 1,12)\%$ для груп 1, 2 та 3 відповідно (табл. 1). Причому в групі 2 серед виявлених патологій більшу частину складали сперматозоїди з аморфними головками та головками з маленькою акросомною областю. Ембріони, утворені після запліднення ооцитів такими сперматозоїдами, не проходять репродуктивний добір та зупиняються на ранніх стадіях розвитку [7, 8].

Таблиця 1

Частота аномалій будови сперматозоїдів у пацієнтів з обструктивною та необструктивною азооспермією

Показник	Група 1	Група 2	Група 3
Аномалії головки	$20,64 \pm 0,93$	$19,3 \pm 2,45$	$20,61 \pm 1,12$
Аномалії шийки	$13,11 \pm 0,88$	$13,69 \pm 1,49$	$12,2 \pm 1,60$
Аномалії хвоста	$5,19 \pm 1,46$	$5,96 \pm 1,52$	$5,04 \pm 1,66$
Змішана патологія	$25,9 \pm 1,38$	$34,6 \pm 4,21^*$	$22,8 \pm 2,44$
Кількість нормальних форм	$34,97 \pm 3,76$	$26,26 \pm 2,68^*$	$39,02 \pm 3,89$

Примітка. * - різниця значуща по відношенню до групи 3, $p<0,05$.

Частота аномалій шийки сперматозоїдів складала $(13,11 \pm 0,88)\%$, $(13,69 \pm 1,49)\%$ та $(12,2 \pm 1,60)\%$ для груп 1-3 відповідно. В групах 1 та 2 найбільш чисельними були аномалії, пов'язані з наявністю залишків цитоплазми на поверхні сперматозоїда, тоді, як в групі 3 відмічали асиметричне прикріплення середньої частини до

головки та «схилену» головку.

Різниця у кількості сперматозоїдів з патологією хвоста у досліджувальних групах була незначуща.

Кількість комбінованих дефектів головки, шийки та середньої частини була значущо вище у сперматозоїдах чоловіків із необструктивною

формою азооспермії.

Дефекти головки є найпоширенішою вадою сперматозоїдів [9]. Їх клінічне значення було описано F. Shaker [10]. Показано, що ін'єкція в ооцит сперматозоїдів з вадами будови головки збільшує частоту переривання вагітності [11]. В нашому дослідженні найпоширенішим відхиленням у будові спермів в групах 1 та 3 було звуження головки, тоді, як в групі 2 – аморфні головки. Аномальне прикріплення шийки або зігнута шийка можуть знизити запліднювальну здатність сперматозоїдів [12]. Наявність залишкової цитоплазми на шийці пов'язують з незрілістю сперматозоїдів та утворенням реактивних видів кисню, які можуть викликати фрагментацію ДНК та негативно впливати на розвиток ембріонів *in vitro* [13-15].

Серед аномалій хвостової частини (різниця частоти утворення якої в групах 1-3 було незначуща) найпоширенішими були синдром короткого хвоста, який, як вважається, детермінується генетично [16].

Таким чином, серед сперматозоїдів, отриманих у пацієнтів з необструктивною азооспермією, значущо вище зустрічалася змішана патологія будови головки, шийки та хвоста. Незважаючи на те, що кількість вад будови шийки сперматозоїдів при необструктивній азооспермії була на

рівні еякуляторних та вилучених при обструктивній азооспермії, кількість клітин з цитоплазматичною краплею була вищою, що свідчить про незрілість цих сперматозоїдів.

Підсумок

Морфологічні характеристики сперматозоїдів отриманих у пацієнтів з необструктивною азооспермією характеризуються збільшенням змішаної патології головки, шийки та хвоста. Більш високий показник сперматозоїдів з аномальними морфофункціональними характеристиками при необструктивній азооспермії порівняно з сперматозоїдами, отриманими у пацієнтів з обструктивною азооспермією та нормозооспермією свідчить про те, що фактори, які призводять до не обструктивної азооспермії, можуть також впливати на морфологічні характеристики сперматозоїдів, хірургічно вилучених із яєчок.

Перспективи подальших розробок

Перспектива подальшої роботи полягає у використанні морфологічних критеріїв сперматозоїдів при прогнозуванні ефективності їх криоконсервування та частоти запліднювальної здатності при проведенні ICSI.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Літературні джерела

References

1. Gorpichenko II, Romanyuk MG. [Male infertility: etiology, pathogenesis, diagnosis and current treatments]. *Men's health*. 2016;1(56):8-17. Ukrainian.
2. Nurimanov KR. [Clinical and laboratory characteristics of male infertility in azoospermia]. *Men's Health*. 2004;4(11):139-140. Ukrainian.
3. Petrushko MP. [The current state of the problem of cryopreservation of human reproductive cells and embryos]. *Bulletin of the National Academy of Sciences of Ukraine*. 2017;(7):44-52. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.15407/vsn2017.07.044>
4. Desai N, Gill P, Tadros NN. Azoospermia and embryo morphokinetics: testicular sperm-derived embryos exhibit delays in early cell cycle events and increased arrest prior to compaction. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(7):1339-48. doi: 10.1007/s10815-018-1183-8
5. Petrushko MP, Pinyayev VI, Podufaliy VV. [Pregnancy after embryo transfer obtained by oocyte fertilization, without of Zona pellucida, with cryopreserved epididymal sperm (case report)]. *Problems of reproduction*. 2013;2:63-5. Ukrainian.
6. World Health Organization. [Who Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interact]. 2010. UP: 287 p.
7. Grischenko VI, Petrushko MP, Pinyayev VI. [Effectiveness of IVF and ET programs depending on the quality and number of embryos transferred]. *Problems of reproduction*. 2000;6(1):44-7. Ukrainian.
8. Yurchuk, T., Petrushko, M. & Fuller, B. [Science of cryopreservation in reproductive medicine - Embryos and oocytes as exemplars]. *Early Hum. Dev.* 2018;14:S0378-3782(18)30559-60. Ukrainian. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2018.08.016
9. Chang V, Heutte L, Petitjean C. Automatic classification of human sperm head morphology. *Comput Biol Med*. 2017;84:205-16. doi:10.1016/j.combiomed.2017.03.029
10. Shaker F, Monadjemi SA, Alirezaie J. A dictionary learning approach for human sperm heads classification. *Comput Biol Med*. 2017;91:181-90. doi:10.1016/j.combiomed.2017.10.009
11. Cao X, Cui Y, Zhang X. The correlation of sperm morphology with unexplained recurrent spontaneous abortion: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8:55646-56. DOI: 10.18632/oncotarget.17233
12. Setti AS, Braga DP, Vingris L. Sperm morphological abnormalities visualised at high magnification predict embryonic development, from fertilisation to the blastocyst stage, in couples undergoing

ICSI. J Assist Reprod Genet. 2014;31(11):1533–9. doi:10.1007/s10815-014-0326-9

13. Petrushko MP, Yurchuk TA, Pinyayev VI. [Penetration test with *Zona pellucida* as a predictor of fertilizing ability of native and cryopreserved human sperm]. Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sports. 2017;1(1):189-92. Ukrainian.

14. Petrushko MP, Pavlovich EV, Pinyayev VI. [Apoptosis and processes of DNA fragmentation in native and cryopreserved human sperm cells at normo- and pathospermia]. Tsitol Genet.

2017;51(4):278–81. Ukrainian. doi: 10.3103/S0095452717040065

15. Petrushko M.P., Pavlovich O.V., Pinyayev V.I. [Processes of DNA fragmentation and peroxidation of lipid in spermatozoa in humans under the norm of pathosperm]. Newsletter of Lviv University. Seriya Biologiya. 2016;74(97):97-103. Ukrainian.

16. Ray PF, Toure A, Metzler-Guillemain C. Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. Clin Genet. 2017;91(2):217–32. doi:10.1111/cge.12905

Панасовський М.Л. Морфологічні особливості тестикулярних та епідидимальних сперматозоїдів чоловіків з азооспермією.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Актуальність вивчення особливостей морфологічних характеристик сперматозоїдів при азооспермії обумовлена високою частотою безплідних шлюбів з чоловічим чинником. Для успішного проведення допоміжних репродуктивних технологій вкрай важливо знання морфологічних характеристик сперміїв, які можуть бути предиктором їх запліднювальної здатності. **Мета дослідження.** Вивчення особливості морфологічних характеристик сперматозоїдів, отриманих хірургічним шляхом у пацієнтів з азооспермією. **Методи дослідження.** Морфологічну оцінку сперматозоїдів проводили за допомогою світлової мікроскопії. В роботі використовували методи статистичної обробки результатів. **Результати.** Морфологічні характеристики сперматозоїдів пацієнтів з необструктивною азооспермією, характеризуються високою частотою змішаної патології головки, шийки та хвоста, яка становить $(34,6 \pm 4,21)\%$, що є значущо більше, ніж у сперміїв пацієнтів з обструктивною азооспермією $(25,9 \pm 1,38)\%$ та нормозооспермією $(22,8 \pm 2,44)\%$. **Підсумок.** Отримані дані щодо морфологічних характеристик сперматозоїдів при обструктивній та необструктивній азооспермії дозволять ввести алгоритм оцінки якості сперматозоїдів для пацієнтів, які проходять лікування методами ДРТ.

Ключові слова: сперматозоїд, безпліддя, обструктивна азооспермія, необструктивна азооспермія, морфологічні характеристики.

Панасовский Н.Л. Морфологические особенности тестикулярных и эпидидимальных сперматозоидов мужчин с азооспермией.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Изучение особенностей морфологических характеристик сперматозоидов при азооспермии обусловлено высокой частотой бесплодных браков с мужским фактором. Для успешного проведения вспомогательных репродуктивных технологий крайне важно знание морфологических характеристик сперматозоидов, которые могут быть предиктором их оплодотворяющей способности. **Цель.** Изучение особенности морфологических характеристик сперматозоидов, полученных хирургическим путем у пациентов с азооспермией. **Методы.** Морфологическую оценку сперматозоидов проводили с помощью световой микроскопии. В работе использовали методы статистической обработки результатов. **Результаты.** Морфологические характеристики сперматозоидов пациентов с необструктивной азооспермией, характеризуются высокой частотой смешанной патологии головки, шейки и хвоста, которая составляет $(34,6 \pm 4,21)\%$, что значительно больше, чем у спермиев пациентов с обструктивной азооспермией $(25,9 \pm 1,38)\%$ и нормозооспермией $(22,8 \pm 2,44)\%$. **Заключение.** Полученные данные морфологических характеристик сперматозоидов при обструктивной и необструктивной азооспермии позволят ввести алгоритм оценки качества сперматозоидов для пациентов, проходящих лечение методами ВРТ.

Ключевые слова: сперматозоид, бесплодие, обструктивная азооспермия, необструктивная азооспермия, морфологические характеристики.