

3. Брискин Б.С. Новый взгляд на структуру запирающего механизма терминального отдела общего желчного протока / Б.С. Брискин, Г.П. Титова, П.В. Эктон [та ін.] // *Анналы хирургической гепатологии*. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 63-71.
4. Брискин Б.С. Эволюция взглядов на строение и функцию замыкающего механизма холедоходуodenального соединения / Б. С. Брискин, П. В. Эктон, Г. П. Титова, Ю. Ф. Клименко // *Международный медицинский журнал*. – 2004. – №1. – С. 95-99.
5. Круцяк В.М. Морфогенез спільної жовчної протоки людини у зародково-вуму періоді онтогенезу / В. М. Круцяк, М. Д. Лютик, Ю. Т. Ахтемійчук // *Буковинський медичний вісник*. – 2001. – Т. 5, № 3-4. – С. 63-64.
6. Колесников Л.Л. Сфинктерология / Л.Л. Колесников // – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 152 с.
7. Молдавская А.А. Вазуляризация производных пищеварительной трубки человека на этапах пренатального онтогенеза / А. А. Молдавская, А. В. Савищев // *Астраханский медицинский журнал*. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 104-107.
8. Chen W. J. Analysis of the arterial supply of the extrahepatic bile ducts and its clinical significance / W. J. Chen, D. J. Ying, Z. J. Liu [et al.] // *Clinical Anatomy*. – 1999. – № 12. – P. 245-249.
9. Fu Y. C. Studies of etiology and management about iatrogenic injuries of bile duct / Y. C. Fu, K. Z. Li, Z. Q. Gao // *Chinese Journal Surgery*. – 1996. – № 34. – P. 33-35.
10. Nakanuma Y. Microstructure and development of the normal and pathologic biliary tract in humans, including blood supply / Y. Nakanuma, M. Hoso, T. Sanzen [et al.] // *Microscopy Research and Technique*. – 1997. – Vol. 38, № 6. – P. 552-570.
11. Yamaguchi H. Blood supply to the duodenal papilla and the communicating artery between the anterior and posterior pancreaticoduodenal arterial arcades / H. Yamaguchi, S. Wakiguchi, G. Murakami [et al.] // *Journal Hepatobiliary Pancreatic Surgery*. – 2001. – № 8. – P. 238-244.

Реферати

РАЗВИТИЕ И СТАНОВЛЕНИЕ ТОПОГРАФИИ СОСТАВНЫХ КОМПОНЕНТОВ СФИНКТЕРНОГО АППАРАТА ВНЕПЕЧЁНОЧНЫХ ЖЕЛЧНЫХ ПРОТОКОВ У ЗАРОДЫШЕЙ И ПРЕДПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

Цигикало А.В.

С целью изучения особенностей развития и становления топографии составных компонентов запирающего аппарата общего желчного протока в раннем периоде онтогенеза исследовано 62 препарата зародышей и предплодов человека 4,5-80,0 мм теменно-копчиковой длины (ТКД). Установлено, что закладка общего желчного протока, двенадцатиперстной кишки, внутри- и внеорганных сосудов происходят на 4-й неделе внутриутробного развития. Слияние общих желчного и поджелудочного протоков, формирование оболочек двенадцатиперстной кишки, очагов внутриорганных сосудобразований обнаружены у зародышей 11,0-13,5 мм ТКД (конец 6-й недели развития). Становление топографии сфинктерного аппарата терминального отдела общего желчного протока начинается в начале предплодового периода. Соединение просветов общего желчного протока и двенадцатиперстной кишки обнаружено у предплодов 20,0-21,0 мм ТКД (конец 7-й недели развития). Формирование большого сосочка двенадцатиперстной кишки выявлено у предплодов 21,0-23,0 мм ТКД (начало 8-й недели развития). В конце 10-й недели развития (предплоды 48,0-53,0 мм ТКД) завершается становление пространственного строения сфинктерного аппарата терминального отдела общего желчного протока: он приобретает косое направление в стенке двенадцатиперстной кишки, окружен её мышечной оболочкой, имеет клапанный аппарат в виде складок слизистой оболочки, подслизистые венозные сплетения.

Ключевые слова: сфинктерный аппарат, внепеченочные желчные протоки, развитие.

Статья надійшла 15.01.2013 р.

DEVELOPMENT AND FORMATION OF THE TOPOGRAPHY OF INTEGRATE COMPONENTS OF THE SPHINCTERIC APPARATUS OF EXTRAHEPATIC BILE DUCTS IN HUMAN EMBRYOS AND PREFETUSES

Tsygikalo O. V.

For the purpose to study the features of the development and formation of topography of integrate components of obturative devices of the common bile duct at an early period of ontogenesis there are 62 specimens of human embryos and prefetuses measuring from 4,5 to 80,0 mm of parietococcygeal length (PCL) has been investigated. It has been established that anlage of common bile duct, duodenum, intra- and extraorgan vessels take place on the 4th weeks of intrauterine development. The fusion of common bile duct and pancreatic duct, formation of duodenal membranes, and centers of intraorgan vessel development has been found in embryos of 11,0-13,5 mm of PCL (the end of 6th week of development). Formation of topography of sphincteric apparatus of the terminal portion of common bile duct starts at the beginning of prefetus period. Connection of lumens of the common bile duct and duodenum has been found in prefetuses of 20,0-21,0 mm of PCL (the end of 7th week of development). Formation of the major duodenal papilla has been exposed in prefetuses of 21,0-23,0 mm of PCL (beginning of 8th week of development). Becoming of spatial structure of sphincteric apparatus of terminal portion of common bile duct is completed at the end of 10th week of development (prefetuses of 48,0-53,0 mm of PCL): it acquires oblique direction in the wall of duodenum, surrounded it muscular membrane, has a valvular apparatus as folds of mucous membrane, and submucous venous plexus.

Key words: sphincteric apparatus, extrahepatic bile ducts, development.

Рецензент Костиленко Ю.П.

УДК 616.697:612.616.2

І.С. Чернокульський, Ю.Б. Чайковський, М.І. Бойко, С.В. Базалицька
Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, ДНУ «Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини», ДУС ДУ «Інститут урології НАМН України», м. Київ

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЧОЛОВІЧИХ ЕЯКУЛЬОВАНИХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ В НОРМІ ТА ПРИ НЕПЛІДНОСТІ

З метою визначення найбільш значимих морфологічних показників спермограми, необхідних для оцінки потенціалу чоловічої фертильності, було досліджено 155 зразків еякуляту здорових донорів та неплідних чоловіків на світлооптичному та ультраструктурному рівнях. Визначено, що найсуттєвішим, статистично значимим показником є патологія головки сперматозоїда, відсоток якої в 2,5 рази більший в групі чоловіків хворих на неплідність. Серед патологічних різновидів головки домінує різниця між показниками форм з маленькою та аморфною головкою і форм з вакуолізованою акросомою – більше, ніж у 3 рази між групами. Інші морфологічні показники змін сперматозоїдів при неплідності приблизно в 2 рази вищі, ніж у здорових донорів. Використання електронної мікроскопії при дослідженні морфології сперматозоїдів дозволяє визначати ультраструктурні дефекти чоловічих гамет, які не візуалізуються на світлооптичному рівні, що значно підвищує відсоток існуючих патологічних форм сперматозоїдів в еякуляті при чоловічій неплідності.

Ключові слова: морфологія сперматозоїдів, параметри спермограми, ультраструктура сперматозоїдів.

Морфологічне дослідження сперматозоїдів відіграє важливу роль в прогнозі потенціалу чоловічої фертильності і в забезпеченні успішності методів допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) [2]. Зіні А. разом із співавторами у своєму дослідженні навіть робить висновок про те, що з усіх параметрів спермограми

морфологія має найбільший позитивний кореляційний зв'язок з клінічним результатом (настання вагітності як *in vivo*, так і *in vitro*) [12]. Цей висновок наголошує на актуальності вивчення питання морфології сперматозоїдів. З введенням ICSI постало питання щодо експертизи рухливості і морфології одного окремого сперматозоїда, для ін'єкції його в яйцеклітину. Причому, з'ясувалось, що неправильні і нерухомі сперматозоїди також могли успішно запліднити яйцеклітину, після чого постало питання про можливість та доцільність залучення їх до циклів ДРТ. Одна група науковців підкреслювала важливість впровадження різних додаткових методик для характеристики патології сперматозоїдів і постановки точного діагнозу, а інші – були схильні використовувати сперматозоїди неплодних чоловіків для ДРТ не приділяючи уваги детальній діагностиці. Пізніше було доведено, що у багатьох пацієнтів із неплодністю має місце порушення генетичного матеріалу, який в залежності від характеру патологій сперми, значно впливає на результат екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) та ICSI та може бути успадкований нащадками. Ймовірно, те чи інше порушення функції пов'язане з певним видом морфологічної аномалії. Отже, різні морфологічні дефекти можуть мати різне прогностичне значення для запліднення методами класичних ЕКЗ та ICSI.

Одноставної думки щодо визначення та детального опису морфологічно нормального сперматозоїда, особливо з огляду його придатності до ICSI, та пропорції сперматозоїдів з нормальною морфологією серед загальної популяції в еякуляті на сьогоднішній день немає. Це обумовлено, в основному, відсутністю єдиних стандартів дослідження морфологічних особливостей сперматозоїдів та суб'єктивністю оцінки показників спермограми. Починаючи з 1980 року керівництво ВООЗ «WHO Manual for Andrology Laboratories» отримало міжнародне визнання як джерело стандартної методології для проведення спермограми. Найбільш поширеним до сьогодні залишається аналіз морфології сперматозоїдів за критеріями, розробленими Kruger і Menkveld [6,7], що традиційно використовується в останніх редакціях рекомендацій ВООЗ по проведенню спермограм. Що стосується відсотку «морфологічно нормальних сперматозоїдів» серед усієї популяції, то ці показники зазнають постійного перегляду. Так, згідно критеріїв ВООЗ 1999 року, серед усієї популяції сперматозоїдів у еякуляті повинно бути як мінімум 30% форм з нормальною морфологією [10]. Що ж до останньої редакції керівництва ВООЗ [11] та «суворих» критеріїв, за норму приймається наявність у еякуляті більше, ніж 14% морфологічно правильних форм, а чоловіки, в яких менше 4% нормальних форм вважаються субфертильними. Результат циклів ЕКЗ, відповідно, буде сумнівний у випадку, коли кількість форм з нормальною морфологією складе менше 14% і поганий, коли – менше 4% [2]. Однак навіть у випадку важкої тератозооспермії можливе настання вагітності за допомогою ICSI [8].

На думку Kruger існуючі позиції нормальної морфології та класифікація дефектних форм сперматозоїдів потребують перегляду. Також він вважає, що залучення електронної мікроскопії – це наступна сходинка на шляху до вивчення проблеми, що допоможе у встановленні більш точного діагнозу [5]. Крім того, передбачається, що морфологічні дефекти прямо пов'язані з функціональною неповноцінністю сперматозоїда [9]. Більш того, на думку Chemes E. та Rawe Y., функціональна неповноцінність сперматозоїда повністю обумовлена морфологічною складовою, що приховується лише за роздільною здатністю оптичної мікроскопії [3]. Ультроструктурна оцінка тератозооспермії в поєднанні з імуноцитохімічними (фрагментація ДНК, визначення наявності та локалізації акросомальних білків, білків цитосклету сперматозоїда та ін.) методами дослідження та визначенням каріотипу дозволяють дати точну характеристику аномалій сперматозоїдів, у тому числі їх структурних, молекулярних та функціональних аспектів.

Тому, актуальними представляються дослідження, спрямовані на пошук критеріїв морфології сперматозоїда, що мають максимальний зв'язок із клінічним результатом (настання вагітності) та розробку специфічних методів лікування чоловічої неплодності. В той же час, вважаємо, що необхідно розглядати морфологію сперматозоїдів тільки як показник потенціалу фертильності, а не як абсолютний індикатор неплодності. В статті представлено детальний опис патологічних форм сперматозоїдів в нормі та при неплодності. Аналогічних даних, які б стосувались дослідження та детального порівняння патологічних форм сперматозоїдів не знайдено в доступній вітчизняній та зарубіжній літературі.

Метою роботи було визначення найбільш значимих морфологічних показників спермограми, необхідних для оцінки потенціалу чоловічої фертильності, на світлооптичному та ультроструктурному рівнях.

Матеріал та методи дослідження. Досліджено 155 зразків сперми, 93 з яких були зібрані від 93 пацієнтів, які звернулись з приводу неплодності до репродуктивних клінік Києва та 62 з яких – від 53 здорових донорів, що звернулись до репродуктивних клінік з метою здачі еякуляту до банку. 10 з 93 зразків сперми від 10 різних пацієнтів було рандомізовано відібрано для детального мікроскопічного дослідження морфологічних особливостей сперматозоїдів на оптичному рівні. 5 з цих 10 зразків також було рандомізовано відібрано для дослідження за допомогою трансмісивної електронної мікроскопії. За для вивчення норми 10 з 62 зразків сперми від 10 різних донорів було рандомізовано відібрані для детального мікроскопічного дослідження морфологічних особливостей на оптичному рівні. Перед включенням до дослідження всі пацієнти були ознайомлені з інформаційним листком пацієнта та давали інформовану згоду на участь в дослідженні.

Критерії включення: вік 18-50 років; неплодність у шлюбі 1-10 років; чоловічий фактор неплодності, за умов нормозооспермії або оліго- і/або астено- і/або тератозооспермії I-III ступеню важкості.

Критерії виключення: вік до 18 або більше 50 років; неплодність у шлюбі більше 10 років; азооспермія; паління, надмірне вживання алкоголю та вплив будь-яких шкідливих фізико-хімічних чинників під час діагностично-лікувальних заходів.

Спермограма. Зразки сперми збирались згідно вимог ВООЗ (2010) методом мастурбації після 2-6 днів утримання від статевого акту [11]. Після чого виконувалось зрідження зразків як мінімум протягом 30 хвилин при 37°C. Показники спермограми (об'єм сперми, концентрація сперматозоїдів, їх рухливість, морфологія та процент живих форм) оцінювались за допомогою світлооптичної мікроскопії, згідно директив, щодо проведення спермограм (ВООЗ, 2010) [11]. З метою дослідження морфології чоловічих гамет використовувалось фарбування препаратів за Папаніколау. Патологічні форми сперматозоїдів опрацьовувались та класифікувались, використовуючи «жорсткі» критерії Крюгера [7]. Використовувався світлооптичний мікроскоп «Carl Zeiss» (Німеччина).

Дослідження морфологічних особливостей сперматозоїдів. Зміни форми головки, зв'язуючої, проміжної та основної частин джгутика, за якими проводилась класифікація патологічних форм сперматозоїдів наведено на рис. 1. Дана класифікація патологічних форм сперматозоїдів розроблена на основі даних керівництва ВООЗ «WHO Manual for Andrology Laboratories» 2010 року [11] та доопрацьована авторами.



Рис.1. Патологічні форми сперматозоїдів (схема)

Електронна мікроскопія сперматозоїдів. Після зрідження, зразок еякуляту центрифугували при 5000g впродовж 5 хвилин і фіксували протягом 12 годин при 4° С в суміші 4% розчину параформальдегіду у фосфатному буфері з рН від 7,2 до 7,4. Далі, сперматозоїди були повторно фіксовані в 1% розчині осмію протягом 1 години, після чого – поетапно, зневодненні етанолом (у порядку зростання: 25, 50, 75, 95 і 100%), а потім 100% ацетоном і залиті епоксидною смолою. Виготовлені ультратонкі зрізи (50-70 нм) були контрастовані ураніл ацетатом – цитратом свинцю за Рейнольдсом та досліджені за допомогою просвічуючого електронного мікроскопу ПЕМ-125К «Selmi». Зображення були отримані за допомогою цифрової камери «Tvips» (Німеччина) та оброблені за допомогою програми «Photoshop» (Adobe, США). По меншій мірі, було проаналізовано 100 зрізів головки і джгутика в кожному із 5 зразків еякуляту. Визначались нормальні та патологічно змінені органи сперматозоїда, які були класифіковані за *Chemes та Rawe* [3].

Статистичний аналіз. Статистичний аналіз результатів дослідження проводився з використанням методів варіаційної статистики. Нами проводилась оцінка частотних характеристик показників для якісних параметрів (P) та середніх величин для кількісних даних (середньої арифметичної - X) з оцінкою їх варіабельності (середнє квадратичне відхилення – σ , мінімум, максимум).

Порівняльний аналіз частотних характеристик показників між групами з оцінкою статистичної значимості різниці проводився з використанням методів порівняння пропорцій (Z-критерій), та критерія Хі-квадрат (χ^2). Для кількісних показників порівняльна оцінка між групами проводилась з використанням критерія Вілкоксона-Манна-Уїтні (U). Нами визначена діагностична (прогностична) значимість окремих клінічних параметрів для результатів лікування. При цьому оцінювались чутливість та специфічність досліджуваних параметрів з визначенням довірчого інтервалу та оцінкою їх статистичної значимості (p). Всі статистичні методи аналізу та розраховані показники оцінювались (порівнювались) при заданому граничному рівні похибки першого роду (α) не вище 5% - $p < 0,05$ (статистична значимість не нижче 95%). Статистичний аналіз вищевказаними параметричними та непараметричними методами проводився з використанням Microsoft Office Excel 2010.

Результати дослідження та їх обговорення. Нормальні і патологічні форми сперматозоїдів складають популяцію одного зразку сперми, де, як правило, завжди міститься відносно велика кількість їх аномальних форм. Зустрічаються форми з аномаліями головки, шийки і джгутика в різному кількісному співвідношенні [1].

Особливості будови чоловічої гамет визначаються її функцією: досягнення та проникнення в цитоплазму яйцеклітини і злиття ядер гамет для утворення диплоїдного набору хромосом – запліднення. Тому, в нормі, чоловічий еякульований сперматозоїд має розширену головку з щільним ядром та акросомою і майже не містить цитоплазми. Хроматин ядра сперматозоїда має найщільнішу структуру серед усіх еукаріотичних клітин, таким чином забезпечуючи мобільність чоловічої гамет. Головка сполучена короткою шийкою з джгутиком (хвостом). Згідно гістологічної номенклатури шийка розглядається в межах джгутика під назвою зв'язуюча частина [4]. Джгутик має складну структуру і окрім вищевказаної (зв'язуючої) частини містить проміжну (серединну), головну та кінцеву частини (рис. 3, 4). **Морфологія нормального сперматозоїда.** Головка при світлооптичній мікроскопії об'ємно менша за хвіст, в нормі овальної або грушоподібної форми з правильним чітким контуром. В нативному препараті її довжина становить 3-5 мкм, ширина – 2-3,5 мкм і співвідношення довжина/ширина – 1,5-1,75. Після фарбування спостерігається невелике зменшення об'єму

гамети. Акросомальна шапочка чітка і займає 40-70% площі головки. Цитоплазматичні включення (реманенти), займають менше третини об'єму головки (рис. 2).

Головка при електронній мікроскопії, зазвичай, грушоподібної форми, відносно симетрична з рівним чітким контуром, частково сплюснена на сагітальному розрізі в її акросомальному відділі. Вона майже вся заповнена гомогенним хроматином, який міститься в межах біламінарної ядерної мембрани. В нормі зустрічаються дефекти конденсації ядерного матеріалу – включення (вакуолі) з досить рівними краями, що не виходять за межі ядра. Близько двох третин ядра кінцевої частини головки вкриті акросомою, з гомогенним вмістом, яка також має бути розміщена в межах біламінарної мембрани з чіткими та рівними краями. Можуть зустрічатися залишки цитоплазми. Зверху головка сперматозоїда вкрита плазматичною мембраною, що відшаровується в процесі фарбування препарату (рис. 3).

Проміжна частина джгутика при світлооптичній мікроскопії тонка та рівна без видимих дефектів, розташована по одній вісі з головою, в ширину – менша за 1 мкм та за довжиною приблизно у 1,5-2 рази перевищує головку. Як варіант норми, спостерігається цитоплазматична крапля (залишок цитоплазми сперматиди), розмір якої не повинен перевищувати третини площі головки (рис. 2).

Зв'язуюча та проміжна частини джгутика при електронній мікроскопії без видимих дефектів, симетричні, розташовані по одній вісі з головою. Зв'язуюча частина джгутика починається від базальної мембрани, що лежить в невеликій западині ядра – суглобовій ямці, під якою містить добре сформовану проксимальну і змінену дистальну центріолі. На рівні дистальної центріолі шийка складається з 9 подовжених поперечних посмугованих стовпів. Від дистальної центріолі відходить осьова нитка (аксонема). Шийка покрита плазматичною мембраною, що продовжується з головки сперматозоїда і в нормі може мати невеликі цитоплазматичні включення. Проміжна частина має форму циліндра діаметром близько 1 мкм, довжиною – 7 мкм. Складається із осової зв'язки мікротрубочок – аксонемі, що оточена мітохондріальною піхвою. Аксонема складається з центральної пари мікротрубочок, що симетрично оточені кільцем з дев'яти периферійних пар мікротрубочок (9+2). В проміжній та головній частині за межами першого кільця, знаходиться друге – з дев'яти щільних волокон (фібрил), менш симетричних за розміщенням та різних за розмірами (9+9+2). Мітохондріальна піхва має форму спіралі, що нараховує 10-14 обертів. Проміжна частина в нормі може бути оточена цитоплазмою та плазматичною мембраною, як і шийка. Як варіант норми, спостерігається цитоплазматична крапля вищезазначених розмірів (рис. 3).



Рис. 2. Нормозооспермія. Визначається головка (Г), проміжна частина джгутика сперматозоїда (ПЧД) та головна частина джгутика сперматозоїда (ГЧД). В ділянці проміжної частини джгутика визначається цитоплазматична крапля (ЦК) нормальних розмірів. Заб. за Папаніколу. $\times 2000$.

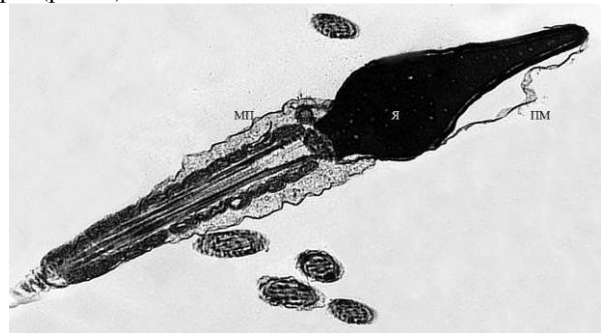


Рис. 3. Морфологічно незмінений еякульований сперматозоїд. Головка, шийка, проміжна та фрагмент головної частини джгутика. На фото позначено мітохондріальну піхву (МП), ядро сперматозоїда (Я) та плазматичну мембрану (ПМ). Електроннограма. $\times 30000$.

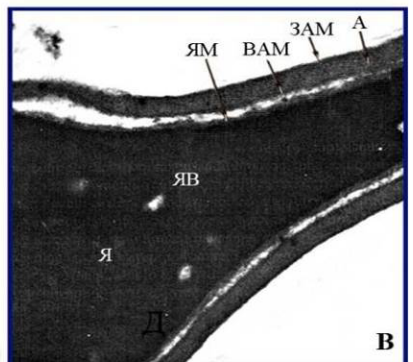
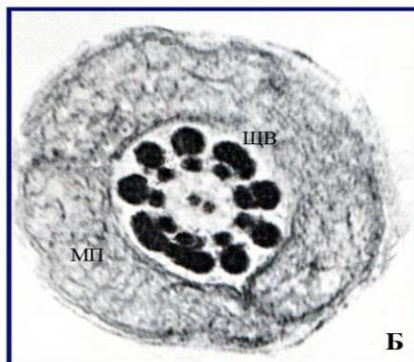
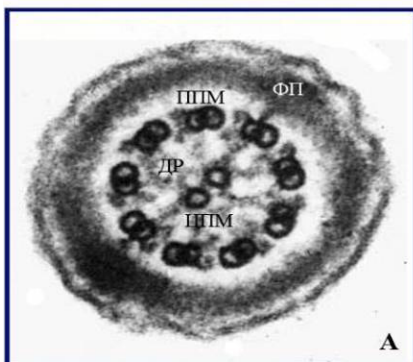


Рис. 4. Морфологічно незмінений еякульований сперматозоїд. А. Кінцева частина джгутика. Показана характерна структура аксонемі, що містить 1 центральну (ЦПМ) та 9 периферичних (ППМ) пар мікротрубочок і динеїнові ручки (ДР). Електроннограма. $\times 180000$. Б. Проміжна частина джгутика. Аксонемі зовні оточують 9 щільних волокон (ЩВ) а в проміжній частині знаходиться мітохондріальна піхва (МП). Електроннограма. $\times 120000$. В. Фрагмент головки. Показано ядро (Я) з типовими ядерними вакуолями (ЯВ), ядерна мембрана (ЯМ), внутрішня акросомна мембрана (ВАМ), зовнішня акросомна мембрана (ЗАМ) та акросома (А). Електроннограма. $\times 60000$.

Джгутик при світлооптичній мікроскопії однорідний за товщиною, дещо тонший за проміжну частину, без видимих дефектів, довжиною 45 мкм, що формує більшу частину довжини сперматозоїда (рис. 2).

Джгуттик при електронній мікроскопії однорідний за товщиною, розмотаний. Діаметр в цьому відділі 0,5 мкм, а довжина складає близько 45 мкм. На поперечному зрізі без видимих дефектів: аксонема та масив щільних волокон починаються від базальної пластинки та простягаються безперервно через мітохондріальну піхву аж до термінальної частини хвоста (останні 5-7 мкм), в якому зберігається тільки аксонема, а щільні волокна закінчуються. Отже в кінцевій частині хвіст має типову структуру війки еукаріотичної клітини (9+2). Зовні аксонема та щільні волокна вкриті фіброзною піхвою, що має сітчасту будову і надає еластичності та жорсткості клітинному скелету. Найбільш поверхнево знаходиться плазматична мембрана, під якою можуть бути залишки цитоплазми (рис. 3). Результати дослідження зразків сперми представлено у таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняння показників спермограм та фрагментації ДНК здорових донорів та неплодних чоловіків

Параметри спермограми		Сперма здорових донорів (n=62)	Сперма неплодних чоловіків (n=93)	Статистична значимість (p)	
Спермограма	Об'єм сперми (мл)	2,63±0,61	3,12±0,87	<0,01	
	Концентрація (млн/мл)	71,10±12,97	18,21±14,24	<0,001	
	Загальна кількість сперматозоїдів (млн)	197,14±58,74	64,07±54,09	<0,001	
	Середня питома вага	Рухливість кат. a (%)	26,29 (24-31)	14,44 (0-56)	<0,001
		Рухливість кат. b (%)	28,37 (22-39)	22,86 (0-58)	<0,001
		Заг. прогресивна рухливість кат. a+b (%)	54,66 (50-64)	37,30 (0-88)	<0,001
		Рухливість кат. c (%)	10,39 (5-18)	17,83 (2-35)	<0,001
		Рухливість кат. d (%)	34,95 (27-39)	44,87 (5-80)	<0,001
		Всього (%)	100	100	-
		Сер. пит. вага	Нормальна морфологія (%)	64,18 (44-78)	40,72 (3-89)
	Патологія головки (%)	14,42 (8-23)	28,18 (4-72)	<0,001	
	Патологія пр. част. (%)	9,11 (4-15)	13,40 (0-29)	<0,001	
	Патологія гол. част. (%)	12,29 (9-24)	17,70 (0-35)	<0,001	
	Всього (%)	100	100	-	
	Сер. пит. вага живих форм (%)	66,95 (62-75)	56,1 (25-95)	<0,001	
	Середня питома вага ФД (%)	9,69 (3-16)	40,59 (7-80)	<0,001	

Отже, можемо констатувати, що найбільше в зразках сперми здорових донорів та неплодних чоловіків відрізняються значення середньої питомої ваги фрагментації спермальної ДНК – більш, ніж в 4 рази [9,69% (3-16%) проти 40,59% (7-80%) відповідно; p<0,001], концентрації – майже в 4 рази (71,10±12,97 млн./мл проти 18,21±14,24 млн./мл відповідно; p<0,001) та загальної кількості сперматозоїдів в еякуляті – дещо більше, ніж в 3 рази (197,14±58,74 млн. проти 64,07±54,09 млн. відповідно; p<0,001). Серед значень середньої питомої ваги показників морфології в здорових донорів та неплодних чоловіків найбільшу різницю показують патологічні форм головки сперматозоїда – майже в 2 рази [14,42% (8-23%) проти 28,18% (4-72%) відповідно; p<0,001]. Значення середньої питомої ваги патологічних форм проміжної та головної частин джгуттика і загальний відсоток нормальних форм сперматозоїдів відрізняються між контрольною та дослідною групами приблизно в 1,5 рази. Що стосується рухливості, то тут найбільшу відмінність між групами мають показники середньої питомої ваги прогресивно-активнорухливої фракції сперматозоїдів (кат. a) – у 1,8 разів [26,29% (24-31%) проти 14,44% (0-56%) відповідно; p<0,001] та непрогресивно рухливих форм (кат. c) – в 1,7 разів [10,39% (5-18%) проти 17,84% (2-35%) відповідно; p<0,001]. Значення середньої питомої ваги загальної прогресивної рухливості (кат. a+b), прогресивно-малорухливих форм сперматозоїдів (кат. b) та нерухливих форм (кат. d) відрізняються менш, ніж в 1,5 рази.

Результати детальної морфології патологічних форм сперматозоїдів представлено у таблиці 2.

Таблиця 2

Порівняння середньої питомої ваги параметрів спермограм здорових донорів та неплодних чоловіків

Параметри патологічної морфології сперматозоїдів		Сперма здорових донорів (n=10)	Сперма неплодних чоловіків (n=10)	Статистична значимість (p)
Патологічні форми, %		42,15 (35,5-52)	81,45 (57,5-96)	<0,001
Загальна патологія головки, %		15,25 (10,5-21)	37,8 (27,5-52)	<0,001
Патологія головки	Конічна, %	1,2 (0-3)	2,8 (0,5-5)	<0,05
	Грушоподібна, %	1,1 (0-4)	2,5 (0,5-5)	<0,05
	Відсутня акросома (глобулозооспермія)	3,85 (2-6)	7,9 (4-13)	<0,05
	Маленька, %	2,1 (1-4,5)	6,7 (2-13)	<0,05
	Аморфна, %	2,1 (1-3,5)	7,1 (3-11)	<0,001
	Вакуалізована, %	1,5 (0-3)	5,2 (2-8)	<0,001
	Маленька акросомальна ділянка, %	2,35 (1,5-3)	3,2 (2-5)	<0,05
Подвосня головки, %	1,05 (0-2,5)	2,4 (0-5)	<0,05	
Загальна патологія пром. част. дж., %		8,8 (6-13)	14,15 (7,5-21)	<0,05
Патологія проміжної частини джгуттика	Зігнута, %	0,9 (0-2)	1,85 (0-4)	Н/3
	Асиметрична, %	3,1 (1-6)	3,95 (1,5-7,5)	Н/3
	Товсте прикріплення, %	1,3 (0-3)	2,7 (0-9,5)	Н/3
	Тонка, %	3,6 (1-6)	6,4 (2-12,5)	<0,05
Загальна патологія голов. част. дж., %		13,7 (11-16)	23,85 (12,5-30,5)	<0,001
Патологія головної частини джгуттика	Короткий, %	0,9 (0-4)	3,75 (1-7,5)	<0,05
	Зігнутий, %	0,5 (0-2)	2,75 (0-8)	<0,05
	Скручений, %	11,4 (9-14)	13,95 (8-21)	Н/3
	Подвосня хвоста, %	0,9 (0-2)	3,4 (1,5-8,5)	<0,05
Цитоплазматична крапля >1/3 головки, %		4,4 (2-9)	5,65 (1-12)	Н/3

Н/3 – статистично не значима різниця.

З нашого дослідження у здорових донорів спостерігається в середньому 42,15% (35,5-52%) патологічних форм серед загальної популяції сперматозоїдів.



Рис. 5. Олігоастенозооспермія. Еякульовані сперматозоїди з патологією головки та проміжної частини джгутика: а, б. Морфологічно нормальні сперматозоїди; в. Патологія проміжної частини джгутика: надлишкова цитоплазматична крапля; г. Патологія головки: вакуолізована акросома. Забарвлення за Папаніколау. $\times 2000$

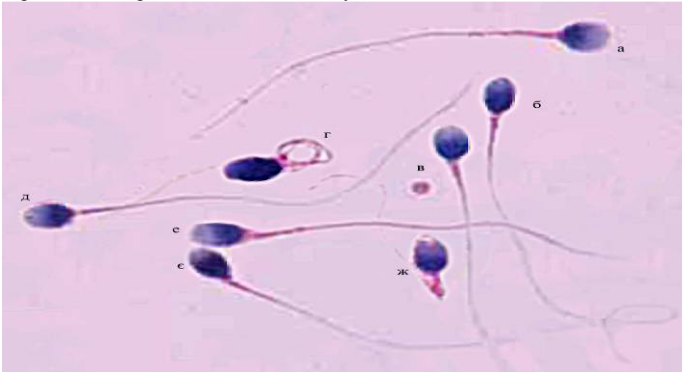


Рис. 6. Астенозооспермія. Еякульовані сперматозоїди з патологією головки, проміжної та основної частини джгутика: а. Патологія головки: кругла (глобулозооспермія, відсутня акросома) головка; б, в, д-е. Морфологічно нормальні сперматозоїди; г. Патологія проміжної та основної частин джгутика: тонка проміжна та скручена основна частини джгутика; ж. Патологія проміжної частини джгутика: зламана проміжна частина джгутика. Забарвлення за Папаніколау. $\times 2000$.



Рис. 7. Олігоастенозооспермія. а. Патологія головки та проміжної частини джгутика: кругла головка та зігнута проміжна частина джгутика; б, г, д. Морфологічно нормальні сперматозоїди; в. Патологія головки та джгутика: конічна головка та подвоєння джгутика; е. Патологія головки та зв'язуючої частини джгутика: кругла головка та зігнута зв'язуюча частина джгутика; е. Патологія проміжної та основної частин джгутика: товста проміжна та основна частини та скручена основна частина джгутика. Заб. за Папаніколау. $\times 2000$.

подвоєнням джгутика (рис. 7в, 8г) 0,9% (0-2%) у контрольній групі проти 3,4% (1,5-8,5%) ($p < 0,05$) у дослідній групі та форм із коротким джгутиком 0,9% (0-4%) проти 3,75% (1-7,5%) ($p < 0,05$). Як видно з таблиці 2 при детальному морфологічному дослідженні відмічається відносно збільшення середньої питомої ваги показників структурних дефектів сперматозоїдів, порівняно з стандартним обстеженням морфології сперматозоїдів при спермограмі (див. табл. 1). Це скоріш за все може бути пов'язано з скрупульозним вивченням зразків еякуляту.

За даними ж інших авторів цей показник складає $14 \pm 5\%$. При детальному дослідженні встановлено, що у здорових донорів спостерігається в середньому форм із патологією головки – 15,25% (10,5-21%), проміжної частини джгутика – 8,8% (6-13%) та основної частини джгутика – 13,7% (11-16%). Також у 4,4% (2-9%) відмічалась надлишкова цитоплазматична крапля (рис. 5в).

В групі неплідних пацієнтів в середньому 81,45% (57,5-96%) патологічних форм з усієї популяції сперматозоїдів, з яких патологія головки займає 37,8% (10,5-21%), 14,15% (7,5-21) – дефекти проміжної частини джгутика, 23,85% (12,5-30,5) – патологія основної частини джгутика, 5,65 (1-12) – надлишкова цитоплазматична крапля (рис. 5в). Тобто, найбільша статистично значима різниця між контрольною та дослідною групою, спостерігається за показниками середньої питомої ваги дефектних форм головки сперматозоїдів 15,25% (10,5-21%) проти 37,8% (27,5-52,5%) ($p < 0,001$), – приблизно в 2,5 разів.

Серед дефектів головки при детальному морфологічному дослідженні сперматозоїдів у пацієнтів з неплідністю, порівняно із здоровими донорами найсуттєвіше та статистично значимо відрізняються показники середньої питомої ваги форм з маленькою та аморфною (рис.6 а) головкою і форм з вакуолізованою акросомою (рис. 9 г) – більш, ніж у 3 рази: 2,1% (1-4,5%) проти 6,7% (2-13%) ($p < 0,05$), 2,1% (1-3,5%) проти 7,1 (3-11%) ($p < 0,001$) та 1,5% (0-3%) проти 5,2 (2-8%) ($p < 0,001$), відповідно. Всі інші показники середньої питомої ваги окремих морфологічних форм сперматозоїдів, при детальному вивченні їх особливостей будови відрізняються приблизно в 2 рази в контрольній та дослідній групах.

При вивченні результатів детального морфологічного дослідження патології проміжної частини джгутика можна відзначити, що статистично значиму відмінність має лише показник середньої питомої ваги форм з тонкою проміжною частиною (рис. 6г) 3,6% (1-6%) проти 6,4% (2-12,5%) ($p < 0,05$). Щодо детального морфологічного дослідження патології основної частини джгутика, можна відмітити, що в 5,5 разів відрізняється показник середньої питомої ваги форм із зігнутою основною частиною джгутика (рис. 6г, 7е) 0,5% (0-2%) проти 2,75% (0-8%) ($p < 0,05$). З інших статистично значимих показників цієї групи слід звернути увагу на значення середньої питомої ваги форм із

Результати електронномікроскопічного дослідження. В жодному із 5 зразків сперми з дослідної групи не було відмічено специфічних дефектів ультраструктур сперматозоїдів, згідно класифікації *Chemes E.* та *Rawe Y.*, натомість відмічались різноманітні ураження – неспецифічні дефекти головки, зв'язуючої, проміжної та основної частин джгутика в різних співвідношеннях. Показова електроннограма патологічних змін органел сперматозоїдів представлена на рис. 9.

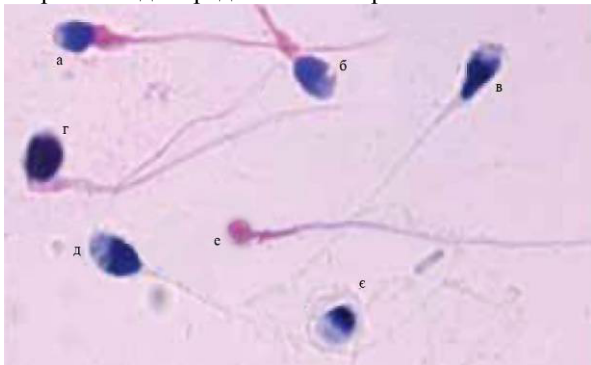


Рис. 8. Олігоастенотерато-зооспермія. Еякульовані сперматозоїди з патологією головки, проміжної та головної частини джгутика. а. Патологія головки та проміжної частини джгутика: аморфна головка з маленькою акросомальною ділянкою та проміжна частина джгутика з товстим прикріпленням; б. Патологія головки та проміжної частини джгутика: вакуалізована маленька акросомальна ділянка та проміжна частина джгутика з товстим прикріпленням; в. Патологія головки: грушоподібна головка; г. Патологія головки та джгутика: кругла (глобулозооспермія, відсутня акросома) головка, зігнута зв'язуюча частина джгутика та подвоєння джгутика; д. Морфологічно нормальний сперматозоїд; е. Ацефалічний сперматозоїд; е. Патологія головки, проміжної частини та головної частини джгутика: кругла (глобулозооспермія, з нормальним розміром акросоми) головка, не візуалізується проміжна та скручена основна частина джгутика. Забарвлення за Папаніколау. $\times 2000$.

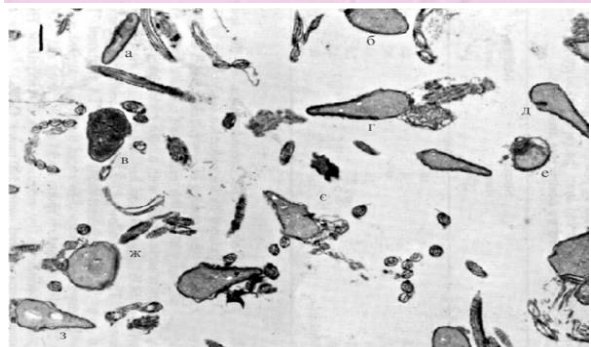


Рис. 9. Еякульовані сперматозоїди з неспецифічними патологіями головки та джгутика. а. Патологія головки: конічна головка; б. Патологія головки: аморфна головка; в. Патологія головки: порушення конденсації хроматину; г. Морфологічно нормальний сперматозоїд; д. Патологія головки: дефект акросоми; е. Патологія головки: вакуалізована акросома; е. Патологія головки: деформована головка; ж. Патологія головки: кругла головка (глобулозооспермія); з. Патологія головки: вакуалізоване ядро. Електроннограма. $\times 15000$.

На серії вивчених нами електроннограм спостерігається значно більше дефектів чоловічих гамет, ніж при світловій мікроскопії, оскільки краще візуалізуються ультраструктури сперматозоїда. Отже, значно зростає і відсоток форм із патологічними змінами головки та джгутика.

Висновки

1. Порівняльний аналіз показників детального дослідження патоморфології сперматозоїдів здорових донорів і неплодних чоловіків свідчить, що найсуттєвішим, статистично значимим показником є патологія головки сперматозоїда, відсоток якої в 2,5 рази більший в групі чоловіків хворих на неплодність.
2. Серед патологічних різновидів головки домінує різниця між показниками форм з маленькою та аморфною головкою і форм з вакуолізованою акросомою – більше, ніж у 3 рази. Інші морфологічні показники змін сперматозоїдів при неплодності приблизно в 2 рази вищі, ніж у здорових донорів.
3. Використання електронної мікроскопії при дослідженні морфології сперматозоїдів дозволяє визначати ультраструктурні дефекти чоловічих гамет, які не візуалізуються на світлооптичному рівні, що значно підвищує відсоток існуючих патологічних форм сперматозоїдів в еякуляті при чоловічій неплодності.

Література

1. Номенклатура.
2. Aitken R.J. The diagnosis of male infertility by semen quality: On the nature of semen quality and infertility / R.J. Aitken, H.W.G. Baker, D.S. Irvine // Hum. Reprod. - 1995, Vol. 10, P.248-250.
3. Chemes E. Historical survey of research on spermatozoa from antiquity to the present / E. Chemes, Rawe Y. Joel // Fertility Disturbances in Men and Women. Basel. Karger, - 1971, 3p.
4. David S. Sperm Morphology, Motility, and Concentration in Fertile and Infertile Men / S. David Guzik, W. James Overstreet, Pam Factor-Litvak [et al.] // N Engl J Med - 2001, Vol. 345, P.1388-1393.
5. Kruger T.F. Sperm morphology features as a prognostic factor in vitro fertilization / T.F. Kruger, R. Menkveld [et al.] // Fertil Steril - 1986, Vol. 46, 118 p.
6. Menkveld R. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria / R. Menkveld, F.S. Stander, T.J. Kotze [et al.] // Hum. Reprod. - 1990, Vol.5, P. 586-592.
7. Menkveld R. Advantages of strict (Tygerberg) criteria for evaluation of sperm morphology / R. Menkveld, T.F. Kruger // Int. J. Androl., - 1995, Vol.18, P.36-42.
8. Ombelet W. Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility / W. Ombelet, R. Menkveld, T.F. Kruger [et al.] // Hum. Reprod. Update - 1995, Vol. 1, P.543-557.
9. Oehninger S. Semen quality is there a paternal effect on pregnancy outcome in in-vitro fertilization intracytoplasmic sperm injection? / S. Oehninger, S. Chaturvedi, J. Toner [et al.] // Hum Reprod - 1998, Vol. 13, P. 2161-2164.
10. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge. - 1999, P.4-33.
11. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Cambridge University Press, Cambridge. - 2010, P.287.
12. Zini A. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men / A. Zini, R. Bielecki, D. Phang [et al.] // Fertil. Steril., - 2001, Vol.75, P.674-677.

Резюме

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МУЖСКИХ ЭЯКУЛИРОВАННЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ В НОРМЕ И ПРИ БЕСПЛОДИИ
Чорнокульський І.С., Чайковський Ю.Б., Бойко М., Базальтський С.В.

С целью определения наиболее значимых морфологических показателей спермограммы, необходимых для оценки потенциала фертильности, было исследовано 155 образцов эякулята здоровых до бесплодных мужчин на светооптическом и ультраструктурном уровнях. Определено, что существенным, статистически значимым показателем патологии головки сперматозоида, процент которой в 2,5 раза больше у мужчин больных бесплодием. Среди патологических разновидностей доминирует разница между показателями форм с маленькой и аморфной головкой и форм с вакуолизованными акросомой - более чем в 3 раз группами. Другие морфологические показатели измененных сперматозоидов бесплодия примерно в 2 раза выше, чем у здоровых доноров. Исследования электронной микроскопии при исследовании морфологии сперматозоидов позволяет определять ультраструктурные дефекты мужских гамет, визуализирующиеся на светооптическом уровне, что значительно повышает процент существующих патологических форм сперматозоидов в эякуляте мужской бесплодия.

Ключевые слова: морфология сперматозоидов, параметры спермограммы, ультраструктура сперматозоидов.

Стаття надійшла 1.11.2013 р.

NORMAL AND INFERTILITY MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MALE EJACULATED SPERMATOZOA
Chornokulskyy I.S., Tchaikovskyy J.B., Boyko M.I., Bazalytska S.

155 samples of healthy donors and infertile men ejaculate were examined at the light and ultrastructural levels in order to determine morphological parameters of spermogram which is important to assess the potential of male fertility. It was determined that the most significant, statistically significant indicator is the pathology of the sperm head, the percentage of which is 2.5 times higher in the group of male patients with infertility. Among the pathological varieties of heads the difference between the rates and forms with a small head and amorphous forms of vacuolised acrosome dominated - more than 3 times between groups. All other indicators of detailed pathologic sperm infertility were in about 2 times higher than in healthy donors. It was also found that in electron microscopic study the percentage of sperm pathological forms was higher due to better visualization of male gametes ultrastructure.

Key words: Sperm Morphology, Sperm Parameters, Sperm Ultrastructure.

Рецензент Костиленко Ю.П.

УДК 611.6 – 092.9: 537.531:612.017:615.37

О.М. Шаранова

ІЗ "Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України, м. Дніпропетровськ

КОРЕЛЯЦІЙНІ ЗВ'ЯЗКИ МІЖ ІМУННИМИ ТА ВНУТРІШНІМИ ОРГАНАМИ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВПЛИВУ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ПОЛЯ ТА ВВЕДЕННЯ НАСТОЯНКИ ЕХІНАЦЕЇ ПУРПУРОВОЇ

В представленому дослідженні визначені кореляційні зв'язки між морфологічними показниками органів імунної та статевих систем щурів, які виникли після опромінення тварин електромагнітним полем високої напруги низької частоти, після чого тварини для запобігання дегенеративним змін в органах одержували розчин ехінацеї пурпурової.

Ключові слова: вилочкова залоза, селезінка, лімфатичний вузол, кістковий мозок, електромагнітне поле.

Однією з проблем, яка викликає зацікавленість науковців в Україні, є вивчення будови важливої системи організму людини – імунної, яка постійно змінюється і від роботи якої залежить функціонування інших органів і систем. В експерименті на тваринах встановлена висока чутливість гістохімічних показників та ультраструктури клітин різних органів імунної системи до дії електромагнітного поля [6]. Звернуто увагу дослідників на межі гістохімічних і структурних перетворень в клітині, тканині, органі, що є морфологічним вираженням процесів, що відбуваються в організмі під дією електромагнітних хвиль. Існує багато підтверджень негативного впливу електромагнітного поля на організм в цілому та окремі органи [1,4]. Деякі автори встановили взаємозв'язки між параметрами окремих органів. Так, Волошин В.М. [3] розкрив зв'язок між показниками абсолютних мас деяких імунних органів, морфологічними параметрами тимусу та селезінки.

Метою роботи було встановлення кореляційних зв'язків між показниками імунних і внутрішніх статевих органів щурів-самців для визначення можливих міжорганних імунологічних реакцій, які відбуваються в організмі тварин, опромінених електромагнітним полем і отримавших імуномодулюючий препарат.

Матеріал та методи дослідження. В дослідженні використано 80 білих беспорідних щурів-самців, які підверглися експериментальній дії електромагнітного поля високої напруги низької частоти, а потім на 14, 30, 45, 90 та 120 добу після закінчення дії електромагнітного поля внутрішньошлунково одержували 7% спиртову настоянку ехінацеї пурпурової з розрахунку 2-2,5 мл/кг маси тварини. Через два дні після введення розчину ехінацеї тварин під легким ефірним наркозом забивали методом евтаназії. Забарвлені зрізи вивчалися в бінокулярному мікроскопі «Leica CME» та світловому мікроскопі «Біолам» з використанням об'єктів окуляр-мікрометра. Вимірялись питома щільність лімфоцитів вилочкової залози, діаметр фолікулів селезінки та лімфатичних вузлів, процентний вміст клітинних диференціальних кісткового мозку, діаметр сім'яних канальців яєчка. Для проведення кореляційного аналізу з використанням комп'ютерної програми Microsoft Office Excel вираховували емпіричний кореляційний момент за формулою [2]: $K = \sum xy / n - \bar{x} \times \bar{y}$, де x, y - числова характеристика ознаки, \bar{x}, \bar{y} - середня величина ознаки, n - обсяг вибірки та вибірковий коефіцієнт кореляції [5]: $r = K / \sqrt{B' \times B''}$, де K - емпіричний кореляційний момент, B' - середнє квадратичне відхилення x , B'' - середнє квадратичне відхилення y .

Результати дослідження та їх обговорення. Кореляційний аналіз проводився між морфометричними показниками тимуса, селезінки, лімфатичних вузлів, кісткового мозку та яєчка. Після визначення середніх величин вище вказаних показників x та y , дисперсії D , середнього квадратичного відхилення σ вираховувався емпіричний кореляційний момент K_{xy} і вибірковий коефіцієнт кореляції r . Якщо r мав значення від -0,3 до +0,3 –