

на хронічний мієлолейкоз, було виявлено достовірне підвищення рівня колонієутворення та проліферативного потенціалу, порівняно із результатами дослідження кісткового мозку пацієнтів із лейкемоїдними реакціями (рис. 1). При дослідженні морфологічного скла-

ду клітин з клітинних агрегатів було виявлено значне підвищення рівня незрілих клітин-попередників. Загалом отримані нами результати підтверджують літературні дані щодо моноклонової природи хронічного мієлолейкозу [9].

1. Домрачева Е. В. Роль цитогенетических исследований при лечении ХМЛ ингибиторами тирозинкиназ / Е. В. Домрачева, Е. А. Асеева // Гематология и трансфузиология. – 2007. – Т. 52, № 2. – С. 25–28.
2. Білько Н. М. Методи експериментальної гематології / Н. М. Білько. – К. : Видавничий дім «Києво-Могилянська академія», 2006. – 66 с.
3. Третьяк Н. М. Гематология / Н. М. Третьяк. – К. : Зовнішня торгівля, 2005. – 240 с.
4. Романова А. Ф. Катионные белки и фагоцитарная активность эозинофилов у больных с хроническим миелолейкозом и лейкемоидными реакциями эозинофильного типа / А. Ф. Романова, И. С. Дягиль // Врачебное дело. – 1988. – № 11. – С. 60–61.
5. Bhatia R. Chronic myelogenous leukemia primitive hematopoietic progenitors demonstrate increased sensitivity to growth factor-induced proliferation and maturation / R. Bhatia, H. A. Munthe, A. D. Williams // Experimental Hematology. – 2000. – Vol. 28, № 12. – P. 1401–1412.
6. Ferrero D. Growth advantage of chronic myeloid leukemia CFU-GM in vitro / D. Ferrero, C. Foli, F. Giaretta // Leukemia. – 2001. – № 15. – P. 422–429.
7. Tefferi A. How to interpret and pursue an abnormal complete blood cell count in adults / A. Tefferi, C. A. Hanson, D. J. Inwards // Mayo Clinic Proceedings. – 2005. – Vol. 80, № 7. – P. 923–936.
8. Диагностика лейкозов. Атлас и практическое руководство / Под ред. Д. Ф. Глузмана. – К. : «Морион», 2000. – 224 с.
9. Nissen-Druey C. Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease / C. Nissen-Druey, A. Tichelli, S. Meyer-Monard // Acta haematologica. – 2005. – Vol. 113, № 1. – P. 72–92.

N. Bilko, I. Dyagil, M. Diachenko, D. Bilko, I. Borbulyak

FUNCTIONING OF HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS IN CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA AND NEUTROFILIC TYPE LEUKEMOID REACTIONS IN THE IN VIVO AND IN VITRO CELL CULTURE

Myeloproliferative diseases arise as a result of neoplastic transformation of a hematopoietic stem cell. To date, a lot of data collected about different characteristics of malignant stem cells in leukemia, but the mechanisms of disease progression and treatment resistance remain unstudied. Leukemoid reactions can occur during different pathological states and are characterized by similar cellular rates in bone marrow and blood as myeloproliferative diseases, but they are not malignant and never progress into the illness they imitate. New methods development for distinguishing myeloproliferative diseases (including Chronic Myelogenous Leukemia – CML) from leukemoid reactions is also extremely relevant today. Therefore, the aim of investigation was to analyze functional activity of blood progenitor cells in CML and neutrofilic type leukemoid reactions of different genesis with application culture models in vitro and in vivo. Colony forming capacity of hemopoietic progenitors of persons with CML is significantly higher compare to leukemoid reaction. Obtained results can be suggested to have diagnostical significance.

Keywords: *hematopoietic progenitor cells, chronic myeloid leukemia, leukemoid reactions.*

УДК 612.616.2

Бараш О. О., Зукін В. Д., Білько Н. М.

ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ ЧОЛОВІЧИХ СТАТЕВИХ КЛІТИН І РЕЗУЛЬТАТИВНІСТЬ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ

Причиною безпліддя подружньої пари у майже половині всіх випадків є чоловічий фактор. Лікування пар з чоловічим непліддям є складним і комплексним питанням сучасної репродуктології. Для покращення ефективності лікування таких пацієнтів було розроблено метод IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection), що дозволяє проводити морфологічний відбір сперматозоїдів для запліднення in vitro на збільшенні до ×6300.

© *Бараш О. О., Зукін В. Д., Білько Н. М., 2010*

*Ретроспективний аналіз довів ефективність застосування IMSI при важких патологіях сперматогенезу. Отримані дані можуть стати підґрунтям для визначення критеріїв включення пацієнтів в програму допоміжного запліднення *in vitro* з використанням IMSI.*

Ключові слова: патології сперматогенезу, IMSI, ранній ембріогенез.

Вступ

Непліддя подружньої пари є поширеною патологією, що охоплює майже 10 % всієї популяції. У половині випадків причиною неплоддя є чоловічий фактор. Впровадження у клінічну практику нових методів допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) суттєво збільшило можливість отримання нащадків при різних формах неплодності, що раніше вважались невиліковними. Найбільш перспективним і ефективним кроком уперед стало вдосконалення методів лікування чоловічого неплоддя, адже використання хірургічних чи консервативних методів лікування наразі не можна вважати достатньо ефективними. Впровадження ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) на початку 1990-х рр. [1] відкрило нові можливості у лікуванні неплоддя у чоловіків та дозволило подолати такі патології, що раніше вважались невиліковними. Методика ICSI як спосіб подолання чоловічого неплоддя використовується сьогодні у тисячах циклів екстракорпорального запліднення в усьому світі [2, 3].

Складність лікування репродуктивних порушень у чоловіків зумовлена тривалістю сперматогенезу і значною кількістю факторів різного генезу, що впливають (чи можуть впливати) на формування нормальних статевих клітин. За наявності будь-яких порушень сперматогенезу, як правило, можлива лише констатація кінцевого результату, що віддзеркалюється параметрами спермограми. Відповідно до параметрів спермограми формується подальша стратегія лікування.

Єдиним можливим шляхом подолання важких форм неплоддя у чоловіків на сьогодні є проведення запліднення *in vitro*, найдосконалішою модифікацією цього методу є IMSI.

На основі узагальнених літературних даних у 1916 р. було зроблено висновок про наявність зв'язку між збільшенням кількості патологічних сперматозоїдів і зниженням фертильності у чоловіків [4]. Пізніше було постульовано кореляцію між зміною розмірів голівки сперматозоїда та репродуктивним потенціалом [5].

Дослідження морфологічних особливостей будови сперматозоїда набуло нового поштовху з розвитком репродуктології та репродуктивної медицини у другій половині минулого століття [6]. Проте жоден з клінічних чи лабораторних показників еякуляту, відомих на сьогодні, не здатен вірогідно гарантувати фертильність певної особи. Морфологічні особливості будови чоловічих статевих клітин як кумулятивні ознаки з самого

початку розглядалися як визначальні, але вони у кінцевому підсумку є ознаками порушень сперматогенезу. Будь-які перехідні форми зазвичай вважаються аномальними [7].

Усі типи аномалій сперматогенезу можна розділити на 3 групи [8]: аномалії руху – астенозооспермії, аномалії чисельності – олігозооспермії та морфологічні аномалії – тератозооспермії. Також можливими є різні варіанти поєднання цих патологій, наприклад олігоастенотератозооспермія.

Роботи останніх років [9, 10] ставлять під сумнів поширену думку про те, що ані тип патології сперматозоїдів, ані її розмір не впливає на результати лікування з використанням екстракорпорального запліднення [11, 12]. Одним з найвірогідніших пояснень розбіжності у результатах наведених досліджень може бути використання різних за технічними характеристиками приладів, що безперечно були помітно вдосконалені останнім часом.

Метод IMSI, що є досконалим поєднанням оптичної мікроскопії і цифрових відеосистем, ґрунтується на морфологічному аналізі субклітинних компонентів сперматозоїдів у режимі реального часу. На сьогодні лише за допомогою IMSI можна дати чітку відповідь на питання співвідношення різних видів патології сперматогенезу та результатів лікування неплоддя методами допоміжних репродуктивних технологій.

Метою дослідження було визначити, при яких саме патологіях сперматогенезу застосування IMSI дає найкращі результати, як впливає морфологічний добір на ефективність лікування чоловіків зі зниженою рухливістю сперматозоїдів та чи варто застосовувати IMSI при нормозооспермії.

Матеріали та методи

Було обстежено 259 подружніх пар, що проходили лікування методами ДРТ у клініці репродуктивної медицини «Надія» з грудня 2007 по грудень 2009 р. Патології сперматогенезу виявляли завдяки оцінці еякуляту. Критеріями включення у дослідження були наявність різних типів його патологій.

Оцінку еякуляту проводили за критеріями ВОЗ [13]. Діагноз «олігозооспермія» ставили при концентрації сперматозоїдів меншій, ніж $20 \times 10^6/\text{мл}$, «астенозооспермія» – при кількості активно рухливих сперматозоїдів меншій, ніж 20 %, «тератозооспермія» – при кількості нормальних форм

сперматозоїдів меншій, ніж 15 % (за Крюгером) [8]. Спермограми та відеозапис руху сперматозоїдів проводили за допомогою автоматизованої системи аналізу еякуляту «Відеотест-Сперм» (Росія).

Виходячи з літературних даних [14], до уваги взяли шість параметрів сперматозоїда (три головних і три другорядних), що за англійською абревіатурою було названо HAVBIC (Head, Acrosome, Vacuole, Basis, Insertion, Cytoplasmic droplet). До головних було віднесено будову голівки, наявність вакуолей і структуру основи сперматозоїда. До другорядних було віднесено будову акросоми, хвостика та наявність залишків цитоплазми на шийці чи голівці сперматозоїда.

Оцінку розмірів сперматозоїда проводили завдяки використанню прозорого шаблону, що накладався на монітор та відображав очікувані розміри сперматозоїда при збільшенні $\times 6600$. Шаблон було виготовлено шляхом масштабування еталонних розмірів голівки сперматозоїда: довжина – $4,75 \pm 0,28 \mu\text{m}$, ширина – $3,28 \pm 0,20 \mu\text{m}$. Співвідношення довжини до ширини мало становити від 1,5 до 1,75. Акросома мала займати від 40 % до 70 % площі всієї голівки сперматозоїда.

Результати дослідження та їх обговорення

Здатність чітко визначити причину непліддя у чоловіків є відправною точкою формування успішної стратегії лікування. Проте для досягнення максимальної ефективності варто не лише визначити причину, а й застосувати найкращі з наявних механізмів для подолання наслідків цієї причини.

Аналіз результатів, отриманих нами протягом двох років застосування морфологічного добору сперматозоїдів, засвідчив очевидну перевагу застосування IMSI при різних патологіях сперматогенезу.

Аналіз ефективності застосування IMSI показав різну ефективність цього методу залежно від типу наявної патології сперматогенезу (рис. 1). Частота дроблення при застосуванні IMSI була значно вищою порівнянно з контролем незалежно від типу патології. Найвища частота дроблення була зафіксована при астенозооспермії – $98,53 \pm 4,3$, найнижча – при астенотератозооспермії – $83,96 \pm 3,6$.

Відомо, що висока частота дроблення може бути обумовлена наявністю правильно сформованого веретена поділу. Визначальну роль у цьому процесі відіграє центріоль. Протягом сперматогенезу дистальна центріоль разом з асоційованими білками елімінується на стадії сперматид. Яйцеклітина втрачає обидві центросоми під час оогенезу, проте повністю зберігає набір білків для їх зворотної асоціації. Одразу після проникнення сперматозоїда у яйцеклітину, центросома сперматозоїда формує веретено поділу з наявних мікротрубочок, що забезпечують міграцію пронуклеусів, сингамію та нормальне дроблення [10].

Частота формування бластоцист є інтегральною ознакою розвитку ембріона *in vitro*, що дозволяє не лише констатувати відсутність блоку розвитку на стадії восьми бластомерів, а й оцінити імплантаційний потенціал ембріона. Аналіз результатів засвідчив збільшення частоти формування бластоцист у пацієнтів з астенотератозооспермією та олігоастенотератозооспермією ($52,09 \pm 2,3$ і $51,8 \pm 1,8$, відповідно) (див. рис. 1), що є свідченням позитивного впливу морфологічного добору сперматозоїдів на результативність пролонгованої культури *in vitro*. Частота формування бластоцист при астенозооспермії дорівнювала $40,38 \pm 2,5$ і достовірно не відрізнялась від контролю – $37,14 \pm 1,6$.

Якість ембріонів була оцінена за відношенням кількості ембріонів найвищої якості до за-

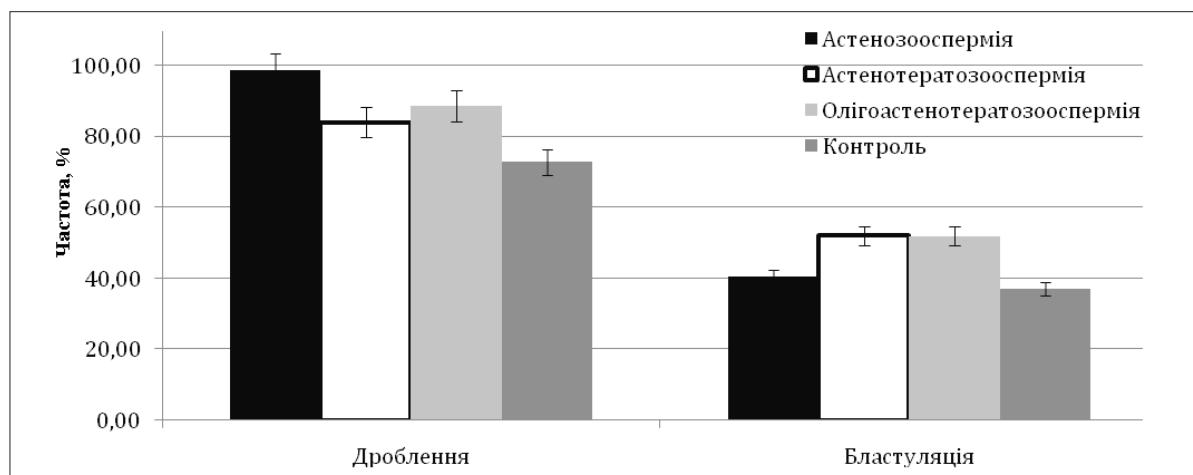


Рис. 1. Частоти дроблення і бластуляції у циклах ДРТ із застосуванням IMSI при різних патологіях сперматогенезу

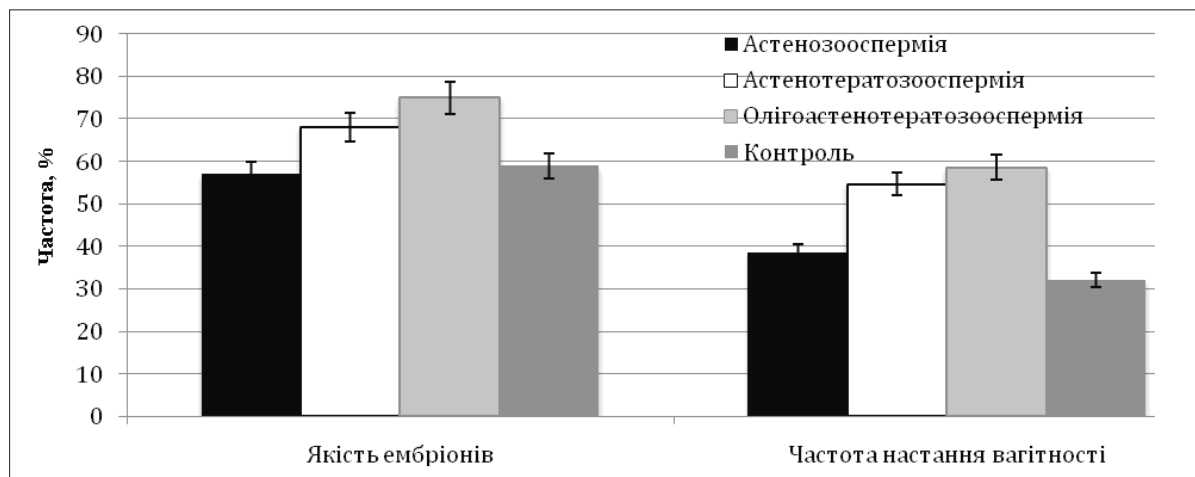


Рис. 2. Якість ембріонів та частота настання вагітності у циклах ДРТ із застосуванням IMSI при різних патологіях сперматогенезу

гальної кількості ембріонів. Кількість ембріонів найвищої якості у циклах ДРТ з використанням IMSI була статистично вищою у групі пацієнтів з високим рівнем морфологічних аномалій. При астеногератозооспермії цей показник дорівнював $75,56 \pm 4,5$, при олігоастеногератозооспермії – $68,32 \pm 3,8$, у той час як у контрольній групі – лише $59,09 \pm 4,1$. У групі пацієнтів, що мали знижену рухливість сперматозоїдів, нами не було зафіксовано достовірного збільшення кількості ембріонів високої якості порівнянно з контролем ($57,60 \pm 2,34$ і $59,59 \pm 4,1$, відповідно) (рис. 2).

Найважливішим фактором оцінки ефективності лікування пацієнтів із непліддям є частота настання клінічно підтверджених вагітностей, адже жоден з клінічних чи лабораторних показників не може гарантувати настання вагітності. У нашому дослідженні було зафіксовано достовірне підвищення частоти настання вагітності у пацієнтів з тератозооспермією при використанні IMSI: у групі пацієнтів з олігоастенотера-

тозооспермією вона становила $58,54 \pm 3,9$, з астеногератозооспермією – $54,68 \pm 2,9$, з астенозооспермією – $38,71 \pm 2,3$. У контрольній групі частота настання вагітності становила $32,11 \pm 2,1$ (рис. 2). При наявності астенозооспермії частоту настання вагітності не вдалося суттєво підвищити, що може свідчити про необхідність застосування інших підходів для таких пацієнтів.

Результати, викладені вище, засвідчили, що використання IMSI при патологіях, не пов'язаних із морфологічними вадами сперматозоїдів, не є доцільним. Нашим наступним кроком була перевірка того, чи є морфологічне дослідження за Крюгером достатньою умовою для включення пацієнта у цикл ДРТ з використанням морфологічного відбору сперматозоїдів при збільшенні $\times 6300$ (рис. 3).

Отже, при проведенні IMSI нами було констатовано достовірне підвищення частот бластуляції ($45,23 \pm 3,1$, у контролі – $32,1 \pm 2,2$) та настання вагітності ($47,22 \pm 3,5$, у контролі – $35,3 \pm 2,9$) у пацієнтів з кількістю морфологічно

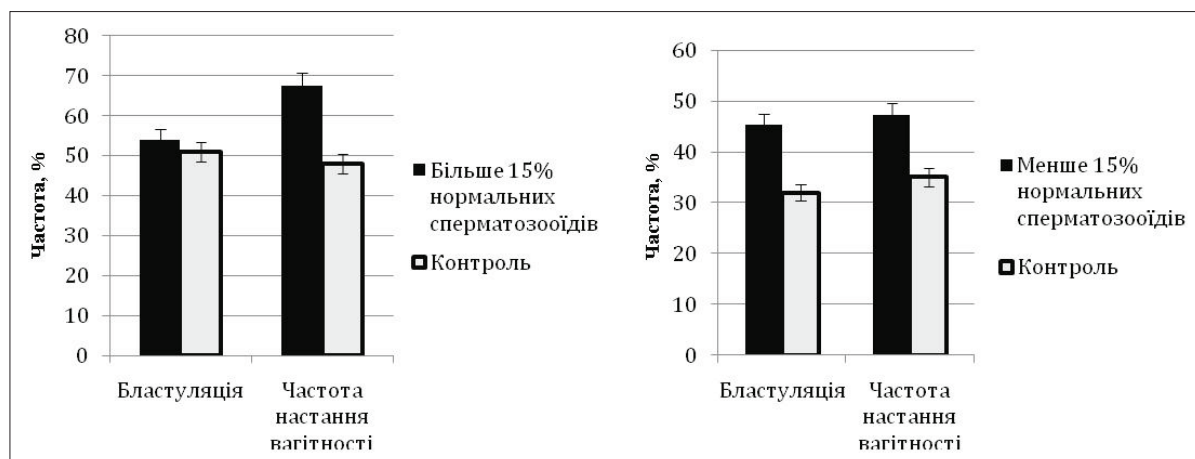


Рис. 3. Частоти бластуляції та настання вагітності залежно від кількості нормальних сперматозоїдів у циклах із використанням IMSI

нормальних сперматозоїдів меншою, ніж 15 %. З іншого боку, навіть за наявності більше 15 % нормальних сперматозоїдів застосування IMSI дозволяє збільшити частоту настання вагітності порівнянно з контролем ($55,4 \pm 4,1$ і $45,3 \pm 3,8$, відповідно).

Висновки

Незважаючи на помітний прогрес у галузі сучасних допоміжних репродуктивних технологій, лікування чоловічого непліддя залишається складною проблемою. Метод морфологічного добору сперматозоїдів для запліднення *in vitro* дозволяє суттєво покращити ефективність лікування пар із важкими формами непліддя у чоловіків. Метод IMSI дає змогу ідентифікувати найменші аномалії будови сперматозоїда, отримати більше інформації для прийняття рішення щодо селекції певного сперматозоїда для запліднення.

Отримані нами результати засвідчили, що застосування IMSI є найбільш ефективним при тератозоосперміях і олігозоосперміях. Використання IMSI при астенозоосперміях потребує подальших досліджень, адже отримані нами результати не показали очевидних переваг морфологічного добору для цієї групи пацієнтів.

Оцінка еякуляту за критеріями Крюгера є важливою прогностичною ознакою ефективності лікування чоловічого непліддя. За наявності менше 15 % нормальних сперматозоїдів використання IMSI є бажаним і доцільним, адже впровадження систем оцінки якості сперматозоїдів перед заплідненням *in vitro* може значно підвищити ефективність лікування у програмах екстракорпорального запліднення. Питання доцільності використання IMSI у всіх без винятку циклах запліднення *in vitro* залишається невирішеним, адже проведення додаткових маніпуляцій з гаметами має бути виправданим і обґрунтованим.

1. Palermo G. Outcome of 300 cycles of assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection / G. Palermo, H. Joris, M. Camus, P. Devroey, A. C. Van Steirteghem // Abstract Book of the International Symposium on Preimplantation Genetics and Assisted Fertilization. – Brussels, Belgium, 1992.
2. Devroey P. A review of ten years experience of ICSI / P. Devroey, A. Van Steirteghem // Hum Reprod Update. – 2004. – Vol. 10 (1). – P. 19–28.
3. Jain T. Trends in the use of intracytoplasmic sperm injection in the United States / T. Jain, R. S. Gupta // New England Journal of Medicine. – 2007. – Vol. 357. – P. 251–257.
4. Cary H. W. Examination of sperm with reference to gynecological aspects / H. W. Cary // Am. J. Obstet. Dis. Women Child. – 1916. – Vol. 74. – P. 615–638.
5. Williams W. Observations on the Seminal Micropathology of Bulls / W. Williams, A. Savage // Cornell Vet. – 1925. – Vol. 15. – P. 353–375.
6. Sillo G. The influence of artificial factors on motility of human spermatozoa / G. Sillo // Fertil Steril. – 1960. – Vol. 11. – P. 235–242.
7. Parinaud J. Influence of sperm parameters on embryo quality / J. Parinaud, R. Mieuisset, G. Vieitez, B. Labal, G. Richoilley // Fertil Steril. – 1993. – Vol. 60(5). – P. 888–892.
8. Kruger T. F. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization / T. F. Kruger, R. Menkveld, F. S. Stander, at al. // Fertil Steril. – 1986. – Vol. 46(6). – P. 1118–1123.
9. Berkovitz A. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection / A. Berkovitz, F. Eltes, H. Lederman, at al. // Biomed Online. – 2006. – Vol. 12(5). – P. 634–638.
10. Cassuto N. G. A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality / N. G. Cassuto, D. Bouret, J. M. Plouchart, at al. // Fertil Steril. – 2009. – Vol. 92(5). – P. 1616–1625.
11. Mansour R. T. The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection / R. T. Mansour, M. A. Aboulghar, G. I. Serour, at al. // Fertil Steril. – 1995. – Vol. 64. – P. 982–986.
12. Svalander P. The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to 'strict criteria' sperm morphology / P. Svalander, A. H. Jakobsson, A. S. Forsberg, at al. // Hum Reprod. – 1996. – Vol. 11. – P. 1019–1022.
13. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction / 4th edition. – Cambridge University Press, 1999.
14. Cassuto G. How to improve the rate of good quality blastocyst after ICSI regarding a new approach for classification of motile human spermatozoa/ G. Cassuto, P. Vanderzvalmen // Fertil Steril. – 2007. – Vol. 88. – P. S90.

O. Barash, V. Zukin, N. Bilko

MALE REPRODUCTIVE CELL MORPHOLOGY AND EFFICIENCY OF *IN VITRO* FERTILIZATION TREATMENT

Male factor is a cause of infertility in a half of all infertility cases. Treatment of male factor is a complex and complicated issue of modern reproductive science. IMSI method (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection) was developed to improve effectiveness of male factor infertility treatment. IMSI based on real-time motile sperm examination and selection for in vitro fertilization under magnification up to $\times 6300$.

Retrospective analysis has shown that IMSI is an effective tool for severe male factor infertility treatment. Data presented can be used as a background for developing indications of using IMSI in assisted reproduction treatment cycles.

Keywords: sperm malformation, IMSI, early embryogenesis.