

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА В ПРОЦЕДУРЕ ИНТРАЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ИНЪЕКЦИИ СПЕРМИЯ (ICSI)

УДК 616.69—008.6:615.256

Поступила 12.04.2010 г.



А.А. Одинцов, к.м.н., зав. отделением вспомогательных репродуктивных технологий¹;

И.Н. Кучков, к.б.н., научный сотрудник^{2,3};

И.В. Черкашина, к.б.н., младший научный сотрудник²;

Т.Е. Потемина, д.м.н., зав. кафедрой патологической физиологии⁴

¹Приволжский областной медицинский центр ФМБА России, Н. Новгород;

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина;

³Центр репродукции и генетики человека «Имплант», Харьков, Украина;

⁴Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

Цель исследования — изучить возможность использования стимулятора подвижности спермиев пентоксифиллина для проведения процедуры интрацитоплазматической инъекции спермия (ICSI) эпидидимальными (PESA) и тестикулярными (TESE) спермиями при дискинезии.

Материалы и методы. Стимуляция подвижности сперматозоидов достигалась добавлением к образцам пентоксифиллина в конечной концентрации 3,5 ммоль/л.

Результаты. Установлено, что использование пентоксифиллина приводит к появлению местнокачающихся клеток как в случае PESA (16,2%), так и при TESE (14,8%). Отмечен высокий уровень оплодотворения ооцитов стимулированными спермиями. Высказывается мнение о целесообразности использования пентоксифиллина для проведения ICSI при получении неподвижных сперматозоидов.

Ключевые слова: спермии человека, пентоксифиллин, ICSI, PESA, TESE.

English

Use of pentoxyphilline in a spermia intracytoplasmatic injection (ICSI) procedure

A.A. Odintsov, c.m.s., head of the lacertus reproductive technology department¹;

I.N. Kuchkov, c.b.s., scientific worker^{2,3};

I.V. Cherkashina, c.b.s., junior scientific worker²;

T.E. Potyomina, M.D., head of a pathologic physiology chair⁴

¹Volga regional medical center of the FMBA of Russia, N. Novgorod;

²Institute of the cryobiology and cryomedicine problems of the Ukraine NAS, Kharkov, Ukraine;

³Center of the «Implant» human reproduction and genetics, Kharkov, Ukraine;

⁴Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod

Aim of investigation is a study of the pentoxyphilline spermia mobility stimulator use possibility for a spermia intracytoplasmatic injection procedure (ICSI) with the epididymal (PESA) and testicular (TESE) spermias at a dyskinesia.

Materials and methods. A stimulation of the spermatozoon mobility was achieved by addition to the pentoxyphilline samples in a terminal concentration of 3.5 mmol/l.

Results. It is established, that a pentoxyphilline use leads to the locally-swaying cell appearance both in a case of PESA (16.2%) and at the TESE (14.8%). A high level of the oocyte fertilization with the stimulated spermias is marked. An opinion of the pentoxyphilline use expediency for the ICSI at the immobile spermatozoon receipt is presented.

Key words: human spermias, pentoxyphilline, ICSI, PESA, TESE.

Для контактов: Потемина Татьяна Евгеньевна, тел. раб. 8(831)465-46-58, тел. моб. +7 903-602-21-08; e-mail: potemin@pisem.net.

В случаях тяжелых форм мужского бесплодия беременность может быть получена с помощью сложной микроманипуляционной операции — интрацитоплазматической инъекции спермия прямо в яйцеклетку (ICSI) [1]. Разработка этого метода расширила возможности лечения мужского бесплодия, продемонстрировав отличные показатели беременности у тех пар, которые раньше, без использования донорской спермы, были обречены на бездетность. Показаниями для ICSI служат: низкие концентрация и подвижность сперматозоидов в эякуляте, сочетанная патология спермы, клинически значимое наличие антиспермальных антител в эякуляте, неудовлетворительное оплодотворение ооцитов *in vitro* или его отсутствие в предыдущей попытке экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), получение спермиев с помощью хирургических операций в процедурах PESA (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration), TESA (Testicular Sperm Aspiration) или TESE (Testicular Sperm Extraction). В каждом из этих случаев констатируется нарушение морфофункциональных свойств клеток, обнаруживаются даже образцы с полностью неподвижными спермиями. Невозможность определить подвижные спермии в эякуляте сильно затрудняет проведение процедуры ICSI, так как неподвижные клетки могут оказаться нежизнеспособными.

Известно, что стимуляторы подвижности — кофеин и пентоксифиллин — улучшают оплодотворяющую способность, повышают криорезистентность спермиев и частоту наступления беременности [2, 3].

Цель исследования — изучение возможности применения пентоксифиллина в процедуре ICSI с использованием эпидидимальных и тестикулярных сперматозоидов.

Материалы и методы. Проведено 47 манипуляций ICSI, в 26 из которых использовались спермии, полученные после процедуры PESA, и в 21 — после процедуры TESE. Во всех случаях в образцах фиксировали неподвижные клетки.

Эпидидимальные сперматозоиды получали микрохирургически из проксимальной области головки придатка. Их аспирировали непосредственно из вскрытого канальца в инсулиновый шприц, заполненный 0,25 мл среды Menezo B2, оценивали подвижность и концентрацию спермиев в аликвоте и центрифугировали в двуслойном градиенте Percoll (80—40%).

Тестикулярные сперматозоиды выделяли из яичек в ходе открытой хирургической процедуры у пациентов с обструктивной азооспермией. Пробу переносили в чашку Петри, содержащую среду Menezo B2, и оценивали под инвертированным микроскопом на предмет наличия спермиев. После удаления фрагментов тестикулярной ткани образцы центрифугировали в двуслойном градиенте Percoll (80—40%).

Стимуляция подвижности сперматозоидов достигалась добавлением к образцам пентоксифиллина в конечной концентрации 3,5 ммоль/л [4].

Подготовку ооцитов проводили по стандартной процедуре контролируемой овариальной стимуляции, применяемой в программе ЭКО [5]. В работе использовали среды ф. MediCult (Дания). Выделение ооцитов

осуществляли трансвагинально под контролем ультразвука. Клетки кумулюса удаляли после инкубации ооцит-кумулясных комплексов в среде с гиалуронидазой SynVibro®Hyadase ф. MediCult (Дания) повторяющейся аспирацией и выталкиванием через поликарбонатные гибкие капилляры уменьшающегося диаметра Cook® Flexipets® (США). ICSI выполнялось на морфологически-интактных ооцитах с экструзией первого полярного тельца. В работе использовали микроманипулятор ф. Narishige (Япония). Инъецированные ооциты исследовали через 16—18 ч на предмет наличия пронуклеусов. Оплодотворение считали нормальным при наличии двух отчетливых пронуклеусов, содержащих нуклеолы.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью U-теста Манна—Уитни и описательной статистики набора средств анализа данных компьютерной программы Microsoft Excel 2007. В качестве критерия достоверности различий принимали уровень 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение. Для проведения процедуры ICSI предпочтительнее использовать подвижные спермии, так как это значительно увеличивает результативность процедуры. В случаях полной неподвижности спермиев, часто наблюдаемых при PESA, TESE или после отогрева замороженных образцов, как правило, применяют тесты на жизнеспособность. Показано [6], что подвижные клетки удалось обнаружить в образцах после 24 ч культивирования в питательной среде. Существующие тесты для определения жизнеспособности спермиев (окрашивание эозин-нигрозином, гипоосмотический тест), которые регламентированы Всемирной Организацией Здравоохранения [7], не позволяют использовать такие клетки в дальнейшем из-за повреждения спермиев [8].

Пентоксифиллин (3,7-диметил-1,5-оксогексилксантин) является ингибитором фосфодиэстеразы из группы метилксантинов. Он препятствует распаду циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), который играет ключевую роль в подвижности спермиев [9]. Во вспомогательных репродуктивных технологиях пентоксифиллин широко применяется при подготовке эякулята для искусственной инсеминации спермой мужа или донора при низких показателях подвижности клеток. Пентоксифиллин является фармакопейным препаратом и широко используется в медицине как спазмолитическое средство.

Добавление препарата к суспензии спермиев в конечной концентрации 3,5 ммоль/л позволило получить достаточный процент местнокачающихся клеток во всех образцах (рис. 1). Колебательные движения клеток появлялись через 5 мин инкубации и в течение 30 мин стимулирующий эффект пентоксифиллина проявлялся полностью. В некоторых случаях отмечалась прогрессивная подвижность спермиев. Нами не установлено достоверной разницы в количестве клеток с колебательным движением, полученных при процедуре PESA — 16,2% или TESE — 14,8%.

Количество нормально оплодотворившихся ооцитов различалось в зависимости от типа сперматозои-

дов. Самый высокий показатель оплодотворения (62,4%) зафиксирован для эпидидимальных спермиев и достоверно ниже — для тестикулярных (41,7%). Контролем в этих исследованиях служили сперматозоиды эякулята — 84,2% (рис. 2).

Известно, что для приобретения оплодотворяющей способности спермии должны капацитировать [7]. Посттестикулярное дозревание является сложным, до конца не выясненным биохимическим процессом. При этом ключевую роль в приобретении сперматозоидом фертильных свойств играют энергозависимые процессы ионного транспорта, изменения подвижности жгутика, поверхностной структуры спермия. Все перечисленные процессы для своей реализации требуют цАМФ — макроэргического субстрата, который является универсальным посредником передачи внутриклеточного сигнала. Добавление пентоксифиллина обеспечивает необходимую концентрацию этого вторичного мессенджера. Мы полагаем, что данный препарат, добавленный к эпидидимальным и тестикулярным спермиям, позволяет запустить *in vitro* процессы капацитации в них. Использование капацитированных спермиев для процедуры ICSI более целесообразно и биологически оправдано, так как в условиях оперативного извлечения из репродуктивного тракта сперматозоиды лишены возможности стать форменными элементами эякулята с соответствующим биохимическим окружением семенной плазмы. Следует отметить, что проявившие под влиянием пентоксифиллина способность двигаться спермии могут быть перенесены в среду инкубации без препарата, где снова станут неподвижными. Этот факт не может препятствовать их дальнейшему использованию в процедуре ICSI. Напротив, в этих условиях происходит отмывка от стимулятора и исключение его возможного вредного воздействия на ооцит.

Заключение. Пентоксифиллин — стимулятор подвижности спермиев человека с четко установленным механизмом действия [2] — целесообразно использовать при проведении процедуры интрацитоплазматической инъекции спермия в случае наличия неподвижных сперматозоидов в образце.

Литература

1. *Joris H., Nagy Z.P., Van de Velde H. et al.* Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Human reproduction* 1997; 13(Suppl. 2): 76—86.
2. *Yovich J.L.* Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. *Human Reproduction* 1993; 8(11): 1786—1791.
3. *Alvarez J.G.* Nurture vs nature: how can we optimize sperm quality? *J Androl* 2003; 24: 640—648.
4. *Лучко Н.А., Грищенко В.И., Кучков И.Н., Калугин Ю.В.* Способ повышения подвижности спермиев человека. Патент №31979А Украины, МПК 6 А61К31/52, А01N1/02. Оpubл. в Б.И., 2000, №7—11, с. 168.

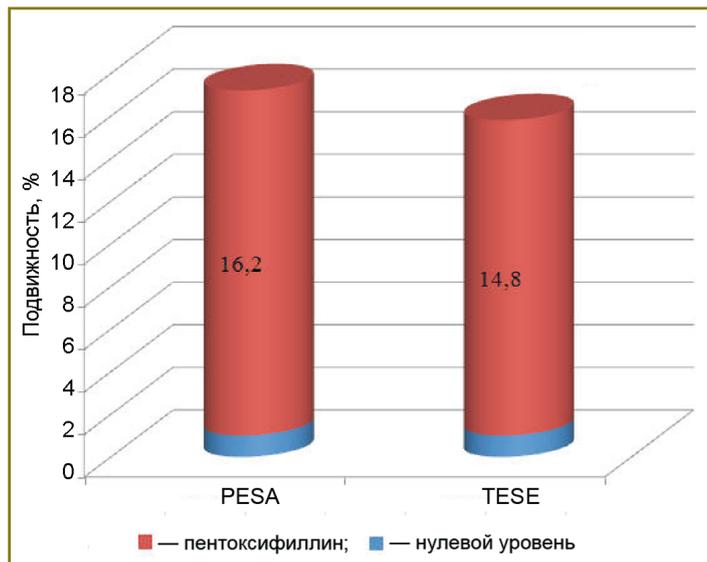


Рис. 1. Увеличение подвижности эпидидимальных (PESA) и тестикулярных (TESE) спермиев после внесения 3,5 ммоль/л пентоксифиллина в среду инкубации неподвижных клеток (нулевой уровень)

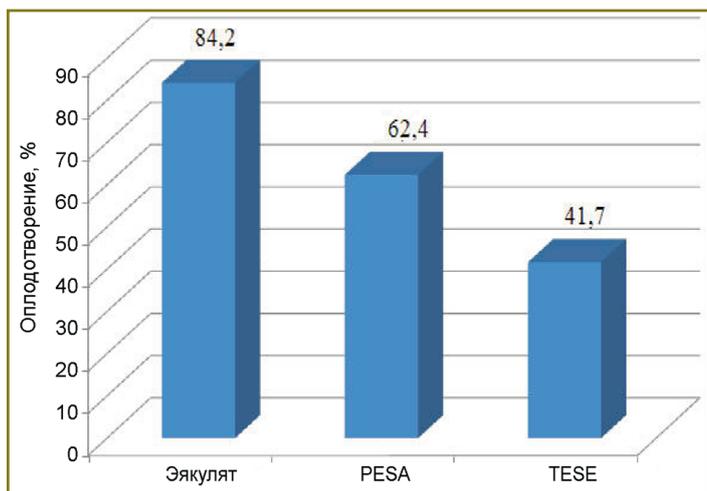


Рис. 2. Исходы ICSI в зависимости от источника получения сперматозоидов

5. *Кулаков В.И., Леонов Б.В., Кузьмичев Л.Н. и др.* Лечение женского и мужского бесплодия. М: Изд-во МИА, 2005; 592 с.
6. *Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A.S. et al.* Increased sperm motility after in-vitro culture of testicular biopsies from obstructive azoospermic patients results in better postthaw recovery rate. *Hum Reprod* 2000; 15: 2371—2374.
7. World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999.
8. *Casper R.F., Meriano J.S., Jarvi K.A. et al.* The hypoosmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril* 1996; 65: 972—976.
9. *Tash J.S., Means A.R.* Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod* 1983; 28: 75—104.