

М.В. Плосконос
**ОЦЕНКА СПОСОБА ГИБЕЛИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА
В УСЛОВИЯХ IN VITRO**
ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Астрахань

Цель исследования – оценка способов гибели человеческих эякуляторных сперматозоидов методами апоптоза и некроза *in vitro*.

Исследованы эякуляты 40 фертильных мужчин в возрасте от 22 до 38 лет. Сперматозоиды выделяли из образцов эякулята, отмывали от семенной плазмы фосфатно-солевым буфером. Подвижность и жизнеспособность половых клеток, в том числе и при наличии маркера апоптоза (экстернализация фосфатидилсерина, выявляемого по связыванию с Аннексином V), были исследованы у свежеевыделенных сперматозоидов и сперматозоидов после 4- и 24-х часов инкубации *in vitro* при температуре 37°C.

После 4-х часов инкубации *in vitro* не было выявлено достоверных изменений параметров сперматозоидов, но после 24-х часов инкубации отмечено снижение подвижности и жизнеспособности половых клеток. Однако эти изменения не сопровождались повышением уровня гамет с маркером апоптотического процесса. В результате проведенного исследования установлено, что эякуляторные сперматозоиды здорового человека не запускают процесс апоптоза в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: сперматозоиды, жизнеспособность, апоптоз, некроз.

M.V. Ploskonos
EVALUATION OF THE METHOD OF HUMAN SPERM CELL DEATH IN VITRO

The aim of the study was to assess the methods of death of human ejaculatory sperm by methods of apoptosis and necrosis *in vitro*.

The ejaculates of 40 fertile men aged 22 to 38 years were studied. Sperms were isolated from ejaculate samples, washed from the seminal plasma with phosphate-salt buffer. Motility and viability of germ cells, including in the presence of apoptosis marker (externalization of phosphatidylserine, detected by binding to Annexin-V) were investigated in freshly isolated sperm and sperm after 4 and 24 hours of incubation *in vitro* at 37°C.

After 4 hours of incubation *in vitro* no significant changes in sperm parameters were found, but after 24 hours of incubation there was a decrease in motility and viability of germ cells. However, these changes were not accompanied by any increase in the level of gametes with the marker of apoptotic process. The study found that ejaculatory sperm of a healthy person does not trigger the process of apoptosis at least *in vitro*.

Key words: sperm, viability, apoptosis, necrosis.

Репродуктивная функция человека является одним из наименее изученных разделов медицины. В настоящее время установлено, что причиной бесплодного брака в 40% случаев является мужской фактор. В Российской Федерации более 4 млн мужчин страдают бесплодием различной формы [1].

Несмотря на значительные успехи современной андрологии в диагностике нарушений репродуктивной функции, структура и причины мужского бесплодия до сих пор не вполне понятны [8].

Причины снижения мужской репродуктивной функции разнообразны и вызываются различными внешними и внутренними факторами. Дисфункция и нежизнеспособность сперматозоидов являются самой частой причиной бесплодия, выявляемого у 1 из 15 мужчин [9].

С внедрением современных вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) стало возможным деторождение от бесплодных мужчин. Одним из наиболее важных и актуальных аспектов репродуктивной медицины является вопрос о жизнеспособности и полноценности мужской гаметы. В большинстве случаев причиной неудовлетворительных исходов ВРТ является активация апоптоза в сперматозоиде [6].

Для мужских гамет важна длительная жизнеспособность, поэтому в норме апоптоз не должен затрагивать эякуляторные сперматозоиды. Однако у зрелых сперматозоидов выявляются признаки апоптоза [7].

Представляет интерес, являются ли маркеры апоптоза результатом неудавшегося апоптотического процесса, начавшегося до эякуляции, или они служат признаком апоптоза, инициированного в постэякуляторный период [3].

Целью данного исследования было оценить способы гибели эякуляторных сперматозоидов человека путем апоптоза или некроза в условиях *in vitro*.

Материал и методы

Образцы спермы были получены от здоровых фертильных доноров (n=40) в возрасте от 22 до 38 лет после 72 часов сексуального воздержания. Основные параметры эякулята (концентрация, подвижность, жизнеспособность и морфология сперматозоидов) были оценены согласно рекомендациям и нормативам, предлагаемым ВОЗ [12]. Все образцы, используемые в исследовании, были отнесены к фертильным согласно критериям ВОЗ.

Сперматозоиды отделяли от спермоплазмы центрифугированием в фосфатно-

солевым буфере (рН=7,4). Клетки ресуспендировали в среде Menezo B-2 (BioMerieux, France). Часть клеточной взвеси отбирали для оценки жизнеспособности свежевыделенных сперматозоидов и маркеров апоптоза. Остальную часть взвеси инкубировали в среде B-2 с 5% CO₂ при 37°C в течение 4- и 24-х часов для оценки спонтанного апоптоза сперматозоидов [4].

Оценку жизнеспособности сперматозоидов проводили окрашиванием их эозином (ЭО) по Bloom [12], используя световую микроскопию. Неокрашенные сперматозоиды являлись жизнеспособными клетками.

Апоптоз определяли по экстернализации фосфатидилсерина (ФС) на поверхность мембраны сперматозоида, используя «аннексиновый» метод. Гаметы окрашивали двумя красителями: Аннексином V, меченым флуоресцеиновым реагентом (AnV-FITC), и пропидия иодидом (PI) (Boehringer Mannheim, Germany), согласно инструкции изготовителя. Оценку результатов проводили с помощью флуоресцентной микроскопии [5].

Неокрашенные (AnV-/PI-) сперматозоиды рассматривались как жизнеспособные. (AnV+/PI-) клетки, окрашенные только Аннексином V, оценивались, как вступившие в ранний апоптоз. (AnV+/PI+) клетки, окрашенные и Аннексином V и PI, а также (AnV-/PI+) клетки, окрашенные только PI, рассматривались как мёртвые (некротические) сперматозоиды.

Значение различий в процентном отношении между окрашенными ЭО, PI и AnV сперматозоидами было оценено с помощью критерия Стьюдента при значении $p < 0,05$ и статистической обработки данных программами «Statistica 6.1 for Windows» (StatSoft Inc.) и EXCEL-2007.

Результаты

После отмывания сперматозоидов от семенной плазмы и инкубирования *in vitro* при 37°C подвижность сперматозоидов статистически значимо не изменялась в течение первых 4-х часов инкубации, но после 24-х часов инкубации процентное содержание неподвижных гамет увеличилось (см. таблицу).

Таблица

Содержание неподвижных, нежизнеспособных (ЭО-положительных и PI-положительных) и апоптотических (AnV+/PI-) сперматозоидов в образцах при разных интервалах инкубации *in vitro*

Время инкубации, ч	Количество сперматозоидов, %			
	неподвижных	ЭО-положительных	PI-положительных	AnV+/PI
0	37,0±2,6	35,0±3,0	21,0±3,0* (p<0,01)	10,3±0,5
4	41,0±3,6	36,8±3,1	28,1±2,6* (p<0,05)	9,0±0,6
24	52,3±4,0# (p<0,01)	44,4±2,0# (p<0,05)	34,5±2,4*# (p<0,05)	8,8±0,9

* Достоверно по сравнению с ЭО-положительными; # достоверно по сравнению со свежевыделенными сперматозоидами (0 ч инкубации) при одном методе оценки.

Процентное содержание нежизнеспособных (некротических) сперматозоидов, окрашенных ЭО или PI, не изменялось в течение первых 4-х часов, но увеличивалось после 24-х часов инкубации *in vitro*.

Сравнение результатов окрашивания гамет ЭО и PI для оценки жизнеспособности как свежевыделенных половых клеток, так и клеток после 24-часовой инкубации показало, что процентное содержание сперматозоидов, окрашенных ЭО, было выше, чем процентное содержание сперматозоидов, окрашенных PI. С другой стороны, процентное содержание сперматозоидов с экспрессией ФС, визуализированной по связыванию с Аннексином V, не изменялось в течение 24-х часов инкубации *in vitro* (спонтанный апоптоз).

Обсуждение

Оценка жизнеспособности сперматозоидов основана на определении целостности наружной мембраны у гаметы, её непроницаемости для витальных красителей, например ЭО, который окрашивает только сперматозоиды с поврежденной мембраной, т.е. нежизнеспособные.

Также для определения жизнеспособности сперматозоидов используют флуоресцентные красители – PI в комбинации с красителем AnV-FITC для того, чтобы определить не только живые и мёртвые, но также и сперматозоиды на разных стадиях апоптоза – ранней и поздней [2, 5].

Выявлено, что сперматозоидов, окрашенных ЭО, было больше, чем окрашенных PI, как в популяции свежевыделенных клеток, так и после 24-часовой инкубации. Действительно, окраска ЭО является цитоплазматической, а PI – ядерной, требующей большего времени для того, чтобы пересечь не только плазматическую мембрану, но и ядерную оболочку. Таким образом, сперматозоиды окрашиваются ЭО быстрее.

Следует отметить, что наблюдаемое нами увеличение процентного содержания неподвижных и нежизнеспособных сперматозоидов после 24-х часов инкубации *in vitro* не сопровождалось статистически значимым увеличением концентрации сперматозоидов с признаками начавшегося апоптотического

процесса – экстернализации ФС. Полученные данные показывают, что смерть половых клеток в течение инкубации *in vitro* при температуре 37°C происходит путём некроза, а не апоптоза.

Некоторые авторы описывают присутствие маркеров апоптоза (экстернализация ФС, фрагментация ДНК, экспрессия Fas-антигена) у сперматозоидов у мужчин с нормальным и нарушенным сперматогенезом [4,10,11].

Однако не ясно, сохраняют ли эякуляторные сперматозоиды способность активизировать связанные с апоптозом процессы или маркеры апоптоза, выявленные у эякуляторных сперматозоидов, маркеры, являющиеся следствием неудавшегося апоптоза, возникающего ещё до эякуляции и связанного с уходом от клеток Сертоли сперматид на ранних стадиях апоптоза [3].

Результаты данного исследования показывают, что наличие маркеров апоптоза у эякуляторных сперматозоидов человека является следствием процессов, происходящих до эякуляции.

Увеличение процентного содержания сперматозоидов, окрашенных ЭО и Р1, наблюдается после 24-х часов инкубации *in vitro*. Если бы у эякуляторных сперматозоидов был начат процесс апоптоза в начале ин-

кубации, тогда увеличение концентрации гамет, экспрессирующих ФС, должно быть обнаружено по крайней мере после 4-х часов инкубации.

В данном исследовании все образцы эякулятов были от здоровых доноров, параметры сперматозоидов которых соответствовали критериям нормы [12]. Поэтому процентное содержание гамет с неудавшимся апоптозом у таких пациентов может быть не высоким. Это объясняет тот факт, почему некроз, а не апоптоз, был причиной клеточной смерти большинства сперматозоидов, которые не выжили в течение 24-х часов инкубации.

Заключение

Таким образом, можно предположить, что гибель эякуляторных сперматозоидов в условиях *in vitro* происходит главным образом в результате некроза, а не в результате апоптоза. Погибая, половые клетки теряют подвижность, поэтому не возникает большого риска принять погибающий сперматозоид за жизнеспособный после продления инкубационного периода *in vitro*. Инкубация спермы *in vitro* до 24-х часов не ставит под угрозу результаты ВРТ по крайней мере при использовании образцов спермы доноров с нормозооспермией. Гибель эякуляторных сперматозоидов мужчин с нарушенным сперматогенезом требует оценки.

Сведения об авторе статьи:

Плосконос Мария Вячеславовна – д.б.н., доцент кафедры химии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России. Адрес: г. Астрахань, ул. Бакинская, 121. E-mail: ploskonoz@mail.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Божедомов, В.А. Мужской фактор бездетного брака: пути решения проблемы / В.А. Божедомов, И.М. Рохликов, Г.Е. Божедомова // Репродуктивные технологии сегодня и завтра: материалы XXVII междунар. конф. РАРЧ, Санкт-Петербург, 6-9 сентября 2017 г. – СПб., 2017. – С. 322-323.
2. Евдокимов, В.В. Применение проточной цитометрии для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека/ В.В. Евдокимов, Л.А. Харламова, Д.Т. Айбатов // Экспер. и клин. урология. – 2012. – № 3. – С. 48-50.
3. Плосконос, М.В. Абортный апоптоз сперматозоидов фертильных мужчин/ М.В. Плосконос // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – № 3. – С. 147.
4. Плосконос, М.В. Исследование экспрессии белков – маркёров апоптоза Fas и FasL – на человеческих сперматозоидах/ М.В. Плосконос // Проблемы репродукции. – 2015. – № 2 (21). – С. 94-97.
5. Плосконос, М.В. Экстернализация фосфатидилсерина на поверхность мембран сперматозоидов под действием оксидативного стресса/ М.В. Плосконос // Российский иммунологический журнал. – 2015. – № 9 (1). – С. 156-157.
6. Плосконос, М.В. Влияние липополисахаридов Chlamydia trachomatis на апоптоз сперматозоидов и развитие мужского бесплодия/ М.В. Плосконос, А.А. Николаев // Урология. – 2014. – № 1. – С.84-87.
7. Agarwal, A. A unique view on male infertility around the globe/ A. Agarwal, A. Mulgund, A. Hamada // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2015. – Vol. 13. – P. 37.
8. Comninos, A. The relationship between gut and adipose hormones, and reproduction/ A. Comninos, C. Jayasena, W. Dhillon // *Hum. Reprod. Update.* – 2014. – Vol. 20, № 2. – P. 153-174.
9. Kashanian J. Male Infertility / J. Kashanian, R. Brannigan // *JAMA.* – 2015. – Vol. 313. – P. 1770.
10. Komija, A. Clinical factors associated with sperm DNA fragmentation in male patients with infertility/A. Komija, T. Kato, Y. Kawachi // *The Scient World J.* – 2014. – Article ID 868303:1-11.
11. Simon, L. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF/L. Simon, I. Proutski, M. Stevenson // *Reprod. Biomed. Online.* – 2013. – Vol. 26, № 1. – P. 68-78.
12. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. – 5th ed. – WHO (Geneva), 2010. – 270 p.

REFERENCES

1. Bozhedomov, V.A. Muzhskoj faktor bezdetnogo braka: puti resheniya problemy / V.A. Bozhedomov, I.M. Rohlikov, G.E. Bozhedomova // *Reproduktivnye tekhnologii segodnya i zavtra: Materialy XXVII mezhdunar. konf. RARCH, Sankt-Peterburg, 6-9 sentyabrya 2017 g.* – Sankt-Peterburg, 2017. – S. 322-323. [In Russ].

2. Evdokimov, V.V. Primenenie protochnoj citometrii dlya ocenki zhiznesposobnosti spermatozoidov cheloveka/ V.V. Evdokimov, L.A. Harlamova, D.T. Ajbyatov // EHKsper. i klin. urologiya. – 2012. – № 3. – S. 48-50. [In Russ].
3. Ploskonos, M.V. «Abortivnyj» apoptoz spermatozoidov fertil'nyh muzhchin/ M.V. Ploskonos // Mezhdunarodnyj zhurnal ehksperimental'nogo obrazovaniya. – 2014. – № 3. – S. 147. [In Russ].
4. Ploskonos, M.V. Issledovanie ehkspressii belkov – markyrovov apoptoza Fas i FasL na chelovecheskih spermatozoidah/ M.V. Ploskonos // Problemy reprodukcii. – 2015. – № 2 (21). – S. 94-97. [In Russ].
5. Ploskonos, M.V. EHKsternalizaciya fosfatidilserina na poverh-nost' membran spermatozoidov pod dejstviem oksidativnogo stressa/ M.V. Ploskonos// Rossijskij immunologicheskij zhurnal. – 2015, № 9 (1). – S. 156-157. [In Russ].
6. Ploskonos, M.V., Nikolaev A.A. Vliyanie lipopolisaharidov CHlamydia trachomatis na apoptoz spermatozoidov i razvitie muzhskogo besplodiya/ M.V. Ploskonos, A.A. Nikolaev // Urologiya. – 2014. – № 1. – S.84-87. [In Russ].
7. Agarwal, A. A unique view on male infertility around the globe/ A. Agarwal, A. Mulgund, A. Hamada // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2015. – Vol. 13. – P. 37.
8. Comminos, A. The relationship between gut and adipose hormones, and reproduction/ A. Comminos, C. Jayasena, W. Dhillon // Hum. Reprod. Update. – 2014. – Vol. 20, № 2. – P. 153-174.
9. Kashanian J. Male Infertility / J. Kashanian, R. Brannigan // JAMA. – 2015. – Vol. 313. – P. 1770.
10. Komija, A. Clinical factors associated with sperm DNA fragmentation in male patients with infertility/A. Komija, T. Kato, Y. Kawachi // The Scient World J. – 2014. – Article ID 868303:1-11.
11. Simon, L. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF/L. Simon, I. Proutski, M. Stevenson // Reprod. Biomed. Online. – 2013. – Vol. 26, № 1. – P. 68-78.
12. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. – 5th ed. – WHO (Geneva), 2010. – 270 p.

УДК 616.9-08: 615.779.9
© Коллектив авторов, 2019

Г.А. Идиатуллина, Ю.З. Габидуллин, З.Г. Габидуллин,
М.М. Туйгунов, А.Г. Губайдуллин, Ф.Ф. Мусыргалина, А.Ф. Ахметзянова
**АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ
ШТАММОВ HAFNIA ALVEI**
*ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Уфа*

Целью нашего исследования явилось определение спектра лекарственной устойчивости клинических штаммов *Hafnia alvei* к наиболее востребованным антибактериальным препаратам. Оценивалась чувствительность бактериофагов к штаммам *Hafnia alvei*. Антибиотикорезистентность изучали на 80 клинических штаммах *Hafnia alvei*, выделенных от больных с желудочно-кишечными, урологическими и гнойно-воспалительными заболеваниями с помощью метода «стандартных дисков», пропитанных широко применяемыми в клинической практике 23 антибиотиками: пенициллин, ампициллин, ампициллин/сульбактам, оксациллин, карбенициллин, линкомицин, канамицин, эритромицин, рифампицин, стрептомицин, гентамицин, тобрамицин, норфлоксацин, гемифлоксацин, моксифлоксацин, тетрациклин, цефуроксимаксетин, цефтазидим, цефепим, левомецетин, нистатин, нитрофуранами (фурадонин, фурагин). Клинический материал получали из разных бактериологических лабораторий Республики Башкортостан. Бактериофаг выделяли по общепринятой методике из клинических отходов лабораторий. Для определения чувствительности бактериофага к клиническим штаммам *Hafnia alvei* использовали метод пятна (spot-test). Анализ результатов показал, что среди клинических штаммов *Hafnia alvei* к цефепиму проявили устойчивость – 7,5% (6 шт.), к цефтазидиму – 11% (9 шт.), к гемифлоксацину – 15% (12 шт.), к моксифлоксацину – 13,7% (11 шт.). 90±3,75% штаммов были одинаково устойчивы к ампицилину, ампициллину/сульбактаму, цефуроксимаксетину, цефалотину. Бактериофаг оказался способен лизировать 65 культур *Hafnia alvei* (81%) из 80 клинических штаммов, в том числе 60 антибиотикоустойчивых штаммов (75%). Обобщая результаты исследований, можно заключить, что цефтазидим, цефепим, гемифлоксацин, моксифлоксацин, бактериофаг могут быть использованы в качестве лечебно-профилактических препаратов при антибактериальной терапии инфекций, вызванных бактериями *Hafnia alvei*, в том числе для антибиотикорезистентных штаммов.

Ключевые слова: бактерии *Hafnia alvei*, метод «бумажных дисков», антибиотики, ампициллин, ампициллин/сульбактам, цефуроксимаксетин, антибиотикорезистентность, бактериофаги.

G.A. Idiatullina, Yu.Z. Gabidullin, Z.G. Gabidullin,
M.M. Tuigunov, A.G. Gubaidullin, F.F. Musirgalina, A.F. Akhmetzyanova
ANTIBIOTIC RESISTANCE OF CLINICAL STRAINS OF HAFNIA ALVEI

The aim of the study was to determine the spectrum of drug resistance of *Hafnia alvei* clinical strains to the most widespread antibacterial drugs. The work evaluated sensitivity of bacteriophages to *Hafnia alvei* strains. Antibiotic resistance was established by disk diffusion test, where disks were saturated with 23 widely used antibiotics: penicillin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, oxacillin, carbeneicillin, lincomycin, kanamycin, erythromycin, rifampicin, streptomycin, gentamycin, tobramycin, norfloxacin, gemifloxacin, moxifloxacin, tetracycline, axetine cefuroxime, ceftazidime, cefepime, chloromycetin, nystatin, and with nitrofurans: nitrofurantoin, furagin on 80 *Hafnia alvei* clinical strains, taken from patients with gastro-intestinal, urological and pyoinflammatory diseases. Clinical material was obtained from bacteriological laboratories of the Republic of Bashkortostan. Bacteriophage was received by a common method from laboratory clinical wastes. To determine sensitivity of bacteriophage to *Hafnia alvei* clinical strains spot-test was applied. Analysis of the results showed that among *Hafnia alvei* clinical strains 7.5% (6 units) were resistant to cefepime, 11% (9 units) to ceftazidime, 15% (12 units) – to gemifloxacin, 13.7% (11 units) – to moxifloxacin and were equally resistant to ampicillin, ampicillin/sulbactam, axetine cefuroxime, cefolatin - 90±3.75. Bacteriophage can lyse 65 cultures (81%) from 80 *Hafnia alvei* clinical strains, including antibiotic resistant – 60 strains (75%). Summering the results, one may conclude, that ceftazidime, cefepime, gemifloxacin, moxifloxacin and bacteriophage can be used as treatment and preventive drugs during antibacterial therapy of infections caused by *Hafnia alvei* bacteria, including antibiotic resistant strains.

Key words: *Hafnia alvei* bacteria, disk diffusion test, antibiotics, ampicillin, ampicillin/sulbactam, axetine cefuroxime, antibiotic resistance, bacteriophages.