УКРАЇНА

(19) UA (11) 114723 (13) C2

(51) МПК (2017.01)
A61B 5/00
G01N 33/50 (2006.01)
A61D 19/00

МІНІСТЕРСТВО ЕКОНОМІЧНОГО РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2014 13813**

(22) Дата подання заявки: **23.12.2014**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.07.2017**

(41) Публікація відомостей про заявку: **27.04.2015, Бюл.№ 8**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.07.2017, Бюл.№ 14**

(72) Винахідник(и):
Клепко Алла Володимирівна (UA),
Андрейченко Сергій Вадимович (UA),
Чернишов Андрій Вікторович (UA),
Кондратова Юлія Анатоліївна (UA),
Ватліцова Ольга Станіславівна (UA),
Мотрина Оксана Анатоліївна (UA),
Горбань Леся Вікторівна (UA),
Саковська Леся Василівна (UA),
Булавицька Вероніка Михайлівна (UA)

(73) Власник(и):
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",
вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050 (UA)

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Клепко А.В., Тачинська Ю.-М.Ш. та ін. Вміст простагландинів та їх гідроксильованих метаболітів у спермі чоловіків, що проживають в різних регіонах України», Журнал НАМН України, 2013, Т. 19, Додаток
Клепко А.В. Вплив тотального опромінення кролів рентгенівськми променями на кількісні зміни вмісту простагландинів, цАМФта іонів металів в їх спермі», Вісник проблем біології і медицини, 2013, Вип. 1, Том 2 (99), стор. 112-116
J.M. Tusell, E Gelpi: «Prostaglandins E and F, and 19-hydroxylated E and F (series I and II) in semen of fertile men: Gas and liquid chromatographic separation with selected ion detection». – J. Chromatogr. - 1980. – Vol. 181. – P. 295-310

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІЙОВАНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПРОСТАГЛАНДИНІВ СПЕРМИ В СЕРІЯХ ЕЯКУЛЯТІВ ЧОЛОВІКІВ З РІЗНИХ РЕГІОНІВ УКРАЇНИ

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі медицини, зокрема до андрології та сексопатології, та стосується диференційованого визначення основних простагландинів сперми об'єднаним газохроматографічно-мас-спектрометричним методом.

UA 114723 C2

Спосіб належить до галузі медицини, а саме андрології та сексопатології, і може бути використаний для визначення порушень простагландинсинтезуючої функції в додаткових статевих залозах, а саме сім'яних везикулах, епідидимісах та простаті, що відповідають за формування сім'яної рідини як основного поживного середовища для сперматозоїдів, за допомогою якої відбувається транспортування чоловічих гамет послідовно до вагіни, матки та фаллопієвих труб жіночого організму для здійснення запліднення яйцеклітини.

Простагландини (ПГ) - це тваринні гормони автокринної та паракринної дії, що утворюються шляхом послідовної дії циклооксигенази (COX-1 або COX-2) та простагландинсинтетази з ненасичених жирних кислот трьох типів - ейкозатриєноєвої, ейкозатетраноєвої та ейкозапентаноєвої, котрі, у свою чергу, є попередниками ПГЕ та ПГФ 1, 2 та 3 серії, відповідно.

У спермі людини знайдено простагландини Е ($Е_1$, $Е_2$, $Е_3$) та Ф ($Ф_{1\alpha}$ та $Ф_{2\alpha}$), тоді як простагландини А та В виявились артефактами, що утворюються з Е-простагландинів за умов тривалого зберігання сперми у невідповідних умовах. Також, в спермі у значно більшій кількості порівняно з первинними ПГ, містяться їх 19-гідроксильовані похідні, а саме 19-ОН ПГЕ та 19-ОН ПГФ.

Встановлено, що $ПГЕ_1$ та $ПГФ_{2\alpha}$ впливають на скорочувальну активність маточного міометрія, тим самим зумовлюючи пересування сперми з вагіни до маточних труб. Крім того, $ПГЕ_1$, $ПГЕ_2$, та 19-ОН $ПГЕ_1$ разом з 19-ОН $ПГЕ_2$ підвищують лінійну швидкість поступального руху сперматозоїдів, тоді як $ПГФ_{2а}$ посилює латеральну рухливість головки та асинусоїдальні рухи сперматозоїдів. $ПГЕ_2$ сприяє здійсненню лейкоцитарної реакції при коїтусі та розвитку локальної імуносупресії в жіночому організмі, тоді як $ПГФ_{2\alpha}$, на відміну від $ПГФ_{1\alpha}$, посилює разом з $ПГЕ_2$ проникність сперми через слизовий бар'єр шийки матки.

ПГЕ та 19-ОН ПГЕ збільшують запліднюючий потенціал сперматозоїдів. Крім того, ПГФ та ПГЕ забезпечують пересування сперматозоїдів по системі закручених сім'яних канальців яєчка та в епідидимісах.

Всі вищенаведені факти вказують на існування прямого зв'язку між наявністю простагландинів у сім'яній рідині та фертилізаційними властивостями сперми.

На теперішній час більшість населення України проживає на радіоактивно та хімічно забруднених територіях. Радіонукліди та токсичні речовини справляють негативний вплив на активно проліферуючі тканини і клітини, зокрема чоловічий сперматогенний епітелій тестикул та ооцити жіночих фолікулів в яєчниках. В результаті почастішали неплідні шлюби, причому основною причиною цього явища може виступати як чоловічий, так і жіночий партнер, або обидва партнери одночасно.

В андрологічній практиці фертильність чоловічого партнера визначають на підставі побудови спермограми за критеріями ВООЗ, де оцінюється об'єм еякуляту, загальну кількість сперматозоїдів, їх рухливість, прямолінійну швидкість, а також загальну морфологію гамет та їх життєздатність. Доведено, що тривале проживання на забруднених територіях спричиняє появу олігоспермії та астеноспермії, що за критеріями ВООЗ має розцінюватись як ознаки непліддя. Однак такі чоловіки дуже часто здатні до здійснення запліднення природним шляхом і можуть мати дітей. У той же час нерідко трапляються випадки ідіопатичної інфертильності, коли спермограма за критеріями ВООЗ повністю знаходиться в межах норми, а чоловік не може мати дітей з якихось незрозумілих причин. Як показали проведені дослідження, плідність умовно інфертильного пацієнта супроводжувалась підвищеним вмістом простагландинів у спермі, тоді як непліддя умовно фертильної людини поєднувалось з низьким рівнем простагландинів у спермі.

Таким чином, розробка простого за алгоритмом виконання, але інформативного щодо кількісного визначення простагландинів різних груп та серій способу, де якнайбільше було б мінімізовано детектування артефактних ПГ, дала б змогу більш широко оцінювати потенційну здатність чоловіків до запліднення та відтворення потомства, а також з високою ймовірністю ідентифікувати неплідного партнера при неплідних шлюбах.

Відомо спосіб кількісного визначення простагландинів у спермі шляхом застосування біотестування скорочувальної активності препаратів відпрепарованих тканинних смужок з кролячої тонкої кишки, прямої кишки хом'яка або дна матки щура розведеною сім'яною рідиною або її ефірними екстрактами у порівнянні з прямою дією різних концентрацій синтетичних $ПГЕ_1$ або $ПГЕ_2$ [1, 2]. Недоліком цих способів є відсутність інформації стосовно кількісного вмісту ПГФ, 19-ОН ПГЕ і 19-ОН ПГФ у спермі, оскільки визначається лише ПГЕ. Крім того, спосіб не бере до уваги скорочувальної активності $ПГФ_{2\alpha}$ та 19-ОН ПГЕ, а тому дає дещо завищені результати навіть для ПГЕ. Крім того, спосіб не пристосований для виконання серійних аналізів.

Вказані недоліки частково вдається подолати шляхом застосування радіоімунологічного або імуноферментного визначення простагландинів [3], за допомогою яких можна одночасно

обробляти десятки зразків. У той же час одночасно аналізувати цілу низку простагландинів Е та Ф різних серій разом з їх 19 гідроксильованими похідними є завданням вкрай важким, оскільки треба мати специфічні антитіла до кожної групи простагландинів, включаючи і серії, а їх у спермі біля десяти, причому кожна простагландин-тестуюча антисироватка може проявляти перехресну реактивність з простагландинами інших груп та серій. До того ж реалізація способу у разі багатофакторного аналізу пов'язана із значними витратами часу, коштів та праці.

Вказані недоліки вдається частково подолати шляхом застосування комбінованої рідинної та газової хроматографії [4]. Недоліком методу є проблеми з ультрафіолетовим детектуванням ПГЕ та 19-ОН ПГЕ, чому певною мірою заважають супутні жирні кислоти. Крім того, метод недостатньо захищає ПГЕ та 19-ОН ПГЕ від перетворення у відповідні простагландини А та В, що спричиняє неоднозначність результатів та появу артефактних груп простагландинів у даних аналізу.

Значного покращення чутливості методу кількісного визначення простагландинів вдалося досягти застосуванням методу газової хроматографії в комбінації з мас-спектрометрією [5]. За цим методом захист кетогрупи ПГЕ здійснювався за допомогою оксимації метоксіаміном зразу ж після отримання еякулятів, а визначення ПГЕ та 19-ОН ПГЕ здійснювалось на газовому хроматографі з полум'яно-іонізуючим детектором, а ПГФ на мас-спектрометрі. Недоліком способу є те, що визначення простагландинів Е та Ф проводиться в різних аліквотах зразка двома відмінними методами, кожний з яких вимагає спеціальної пробопідготовки.

Прототипом способу, що заявляється, слід вважати спосіб кількісного визначення простагландинів у спермі за допомогою об'єднаної газо-хромато-мас-спектрометрії, відповідно до протоколу якого сперму використовують для аналізу не більш, ніж впродовж 30 хв після еякуляції у чисто вимиті скляні контейнери. Сперму центрифугували протягом 5 хв. при 17500 g. Супернатант, що складався з сім'яної рідини, спочатку збовтували, а потім його аліквоту у кількості в 1,5 мл разом з 50 мкл внутрішнього стандарту, що являв собою дейтерований простагландин $Ф_{2\alpha}$ ($ПГФ_{2\alpha}Д4$), розміщували на мембранному фільтрі діаметром 2,5 см та переносили в камеру для ультрафільтрації об'ємом в 17 мл фірми Millipore, що була попередньо оснащена PSAC мембраною з пропускною спроможністю пор для макромолекул з молекулярною вагою не більш, ніж 1000 дальтон (Д).

Фільтрація здійснювалась при тиску в 8,5 кг/см^2, щоб отримати дуже прозорий ультрафільтрат. Осад, що залишився на мембрані, промивали 2 мл метанолу і профільтровували, а потім висушували у струмі очищеного гелію та об'єднували з попередньо отриманою водною порцією ультрафільтрату.

Об'єднаний ультрафільтрат доводили 1 н соляною кислотою (НС1) до рН 3 та тричі екстрагували рівним за об'ємом етилацетатом. Екстракти об'єднували та випаровували за допомогою гелію. Отриманий осад розчиняли в 40 мкл суміші N,O-біс(триметилсиліл)трифлуороацетаміду з піперидином (1:1) при 60 °С протягом 30 хв. Згодом розчин за допомогою мікрошприца вводили у прилад газохромато-мас-спектрометра, причому для кожного екстракту робили п'ять повторів. Мас-спектри отримували за наступних умов: енергія електронів - 70 ев, транспортуюча напруга 1800 в, струм емісії 80 мкА, температура джерела струму 180 °С. На газовому хроматографі розділення компонентів проводилось на колонці довжиною в 4 м та внутрішнім діаметром у 2,5 см, заповненій Dexsil 300 при 280 °С.

Недоліком даного способу є те, що він дає можливість працювати лише зі свіжою, щойно зібраною спермою, хоча в умовах України спермодонори розкидані по різних регіонах великої території і потрібен певний час для доставки біоматеріалу до місця проведення хімічного та цитологічного аналізу зібраних проб. Крім того, автори не проводять розрідження сперми перед центрифугуванням, а працюють безпосередньо з колоїдом, що не залишає можливості для цитологічної оцінки сперми за критеріями ВООЗ та значно підвищує адсорбцію вільних простагландинів сім'яної рідини осадом самих сперматозоїдів. До того ж, не робиться ніяких спроб до реекстракції адсорбованих простагландинів. При центрифугуванні колоїду використовуються досить великі значення g, що обмежує можливості застосування методу, оскільки потужні центрифуги з великою швидкістю обертання ротора в андрологічних та медико-діагностичних лабораторіях, як правило, відсутні. Недоліком способу також є і те, що сім'яна рідина в камеру для ультрафільтрації вноситься на мембранній підкладці, а не у вільному стані, що значно зменшує ефективність ультрафільтрації простагландинів. Крім того, екстракцію простагландинів з ультрафільтрату здійснюють лише етилацетатом при рН 3, тоді як у роботі [6] показано, що при таких рН екстракція 19-ОН ПГ не перевищує 20 %, а діетиловий ефір, що є визнаним розчинником первинних простагландинів, взагалі не використовують. Усі перелічені недоліки зумовлюють суттєві втрати простагландинів на кожній стадії хімічної обробки проб, що робить кінцеві результати щодо вмісту простагландинів сперми малодостовірними і далекими

від реальності. За прототипом неможливо проведення серійних аналізів та епідеміологічних досліджень у когортах пацієнтів з різних регіонів країни, які знаходяться на далекій відстані від спеціалізованої хімічної лабораторії, оснащеної дорогим газохромато-мас-спектрометром.

Задачею винаходу є максимальне зменшення втрат початкової кількості вільних простагландинів сім'яної рідини за рахунок їх деградації або перетворення первинних простагландинів сперми у простагландини інших груп (A, B) чи їх похідні, що досягається застосуванням кріоконсервації у рідкому азоті для зберігання сперми та її транспортування до місця аналізу у замороженому стані. Це дасть змогу накопичувати зразки сперми для подальшого проведення серійних цитологічних та хімічних аналізів. Крім того, задачею заявленого винаходу є оптимізація процесу екстракції простагландинів із сперми з тим, щоб уникнути втрат на різних етапах хімічної очистки та максимально наблизити результати аналізу до реального розподілу простагландинів за концентраційними складовими по їх групах та серіях.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки прототипу і забезпечує довготривале та безпечне зберігання біоматеріалу до моменту здійснення лабораторного аналізу без зміни первинного кількісного розподілу простагландинів у сім'яній рідині. До того ж спосіб дозволяє оптимізувати процедуру виділення простагландинів, зробити її придатною до застосування в звичайних медико-біологічних лабораторіях діагностичного профілю, а також уникнути втрат та деградації простагландинів під час їх екстракції зі сперми та підготовки до мас-спектрометрії. Крім того, більш повне розділення суміші простагландинів досягалось шляхом використання замість колонки 4 м × 0,25 см, заповненої Dexsil 300. при 280 °С капілярної колонки 30 м×0,25 см з наповнювачем DB 1701 при 275 °С.

При розробці способу поставлені задачі були вирішені шляхом проведення розрідження сперми зразу після еякуляції протягом 40-60 хв. з наступним відокремленням сім'яної рідини від сперматозоїдів при 3000 g 15 хв., промивкою сперматозоїдів 0,1н фосфатним буфером та повторним центрифугуванням та об'єднанням двох супернатантів. Кріоконсервація зразків у рідкому азоті здійснюється або зразу ж після збору та розрідження свіжої сперми. Задачу оптимізації процедури екстракції було вирішено шляхом трансформування сперми з колоїду у розчинний стан і застосуванням при ультрафільтрації ін'єкції сім'яної рідини до камери об'ємом у 10 мл, модель 8010 фірми "Millipore". Екстракція простагландинів здійснювалась двостадійно, спочатку 10 об'ємами діетилового ефіру при pH 3, а потім одним об'ємом етилацетату при pH 4. Екстракти кожного розчинника випаровувались у струмі гелію, а потім об'єднувались та піддавались хімічній трансформації з N,O-біс (триметилсиліл)трифлуороацетамідом при 60 °С протягом 30 хв для отримання триметилсилілових (ТМС) похідних простагландинів по всіх кето, карбоксильних та гідроксильних групах, а саме $(ТМС)_4$ ПГ та $(ТМС)_5$ ПГ. Ці хімічні сполуки є зручним матеріалом для подальшого газохроматографічного розділення та мас-спектрометрії, котра проводилась на приладі "Agilent 5975C GC/MSD".

Ефективність запропонованого способу продемонстровано наступними прикладами:

Приклад 1

Збір сперми проводили шляхом мастурбації у чисті скляні контейнери після 3 днів статевого утримання. У цьому дослідженні приймали участь чоловіки-спермодонори за їх власною згодою та за умов, що об'єм еякуляту після мастурбації становив не менше 4 мл. Зібрану сперму піддавали розрідженню, залишивши стояти у контейнері протягом 40-60 хв за звичайних умов (t=20 °С та P=760 мм рт. ст.). Згодом 0,1 мл розрідженої сперми використовували для негайного визначення життєдіяльності, рухливості та морфологічних ознак сперматозоїдів, для чого краплину суспензії за допомогою скляної палички переносили на предметне скло та накривали покривним скельцем. Тимчасовий препарат зразу ж використовували для підрахунку загальної та поступальної рухливості, а також швидкого лінійного руху сперматозоїдів під мікроскопом МБИ-6 (Росія) на збільшенні х400. Підраховували по 200 навмання відібраних сперматозоїдів у двох різних полях зору. Визначення життєздатності проводили на іншому тимчасовому препараті за допомогою вітального фарбування сперматозоїдів сумішшю 10 % нігрозину та 1 % еозину (10:1) у фізіологічному розчині. Життєздатні сперматозоїди залишались непофарбованими і непроникними для барвника, тоді як загиблі нежиттєздатні сперматозоїди мали рожеве або червоне забарвлення.

Морфологічну будову сперматозоїдів та присутність морфологічних аномалій аналізували після проведення фіксації та фарбування препаратів сперматозоїдів гематоксилін-еозином за методом Папаніколау. Мікроскопічний аналіз таких препаратів проводився на збільшенні х1000 [8].

Основний еякулят зразу ж після розрідження поділяли на 2 частини приблизно по 2 мл кожна. Першу частину використовували терміново для екстракції простагландинів, а другу у

пластиковій пробірці швидко заморожували у рідкому азоті і зберігали безпосередньо у д'юарі протягом 6 місяців. Після закінчення вказаного терміну зразки сперми діставали з д'юару і розморожували за наступною схемою: 20 хв при t=-20 °С, 30 хв. при t=0-4 °С, а потім при t=20 °С-15 хв. до повного розмороження проби.

Екстракція простагландинів та хімічна підготовка зразків для кількісного визначення різних груп та серій простагландинів, а також їх 19-гідроксильованих похідних газохромато-мас-спектрометрично проводились як у випадку свіжозібраної сперми, так і після кріозберігання за одною загальною схемою.

На першому етапі сперму розділяли на сперматозоїди та сім'яну рідину. З цієї мети проводили центрифугування при 3000 g 15 хв. при 4 °С. Супернатант відокремлювали, а у осад добавляли 2 мл цитратного буферу 0,1 М (pH 3,6) на фізіологічному розчині, перемішували скляною паличкою та знов центрифугували. Супернатант об'єднували, а знов утворений осад викидали.

Об'єднаний супернатант, що являв собою очищену від сперматозоїдів та супутніх клітин сім'яну рідину переносили у 10 мл камеру для ультрафільтрації "Millipore" (модель 8010), що була оснащена автоматичною мішалкою та PL AC мембраною (d=2,5 см) з порами, проникними лише для макромолекул з молекулярною вагою не більше 1000 Д. Фільтрацію здійснювали під тиском 8,0 кг/см. Осад на мембрані промивали 0,1 М цитратним буфером (pH 3,6) та відфільтровували. Перед ультрафільтрацією до сім'яної рідини добавляли 50 мкл дейтерованого простагландину ($ПГФ2_{\alpha}$ $Д_4$).

Загальний ультрафільтрат сім'яної рідини тестували за допомогою лакмусового папірця на pH, після чого за допомогою декількох крапель розчину 1 н соляної кислоти (HCl) доводили pH до 3 та проводили екстракцію 10-кратним за об'ємом діетиловим ефіром, після чого ефір випаровували в струмі гелію до сухого залишку 1.

Натомість водну фазу доводили 1 н HCl до pH 4 та екстрагували двічі рівним за об'ємом етилацетатом. Екстракт випаровували у струмі гелію до сухого залишку 2. Згодом залишки 1 та 2 об'єднували, розчиняли у суміші N,O-біс(триметилсиліл)флуороацетаміду (БТМСФА) з піперидином (1:1) при 60 °С протягом 30 хв.

Паралельно синтетичні препарати різних простагландинів у кількості 20-40 мкг кожний ($ПГЕ_1$, $ПГЕ_2$, $ПГФ_{1\alpha}$, $ПГФ_{2\alpha}$, 18-ОН $ПГЕ_1$; 19-ОН $ПГЕ_2$; 19-ОН $ПГФ_{1\alpha}$, 19-ОН $ПГФ_{2\alpha}$, $ПГА_1$; $ПГА_2$; $ПГВ_1$; $ПГВ_2$) роздільно хімічно модифікували в 40 мкл БТМСФА-піперидину (1:1) 30 хв. при 60 °С.

Спочатку хімічно підготовлені зразки разом із стандартами порціями в 1 мкл вводили по черзі за допомогою Agilent 7693 автосамплера у газовий хроматограф Agilent 7890A, що був оснащений капілярною колонкою довжиною в 30 м та внутрішнім діаметром в 0,25 мм з хімічно зв'язаною стаціонарною фазою з ДВ1701 (14 % ціанопропілфенілу, 86 % диметилполісилоксану) з товщиною шару в 0,25 мкм. Хроматографічне розділення речовин на колонці відбувалось при температурі 275 °С. Колоночний елюат направлявся до мас-селективного детектору Agilent 5975C з температурою джерела іонізації в 200 °С. Іони генерувались електронним потоком з енергією в 70 еВ при струмі емісії в 2 мА та прискорюючій напрузі 1500-1800В. Швидкість руху газової фази через капілярну колонку була 1 мл/хв. Мас-спектри детектувались для іонів 60-800 m/z.

Кількісне визначення різних простагландинів та їх 19 гідроксильованих похідних проводилось за допомогою функції AutoQuant на підставі використання калібрувальних кривих, що були побудовані шляхом визначення співвідношень між силою прояву сигналів маркерних іонів всіх стандартних простагландинів і їх 19-ОН ПГ за умови декілька разової зміни початкової концентрації кожної стандартної речовини у зразку, з одного боку, та сигналом дейтерованого $ПГФ_{2\alpha}Д_4$ відомої кількості як внутрішнього стандарту, з іншого боку.

Кількісний аналіз простагландинів у зразках сім'яної рідини проводився шляхом підрахунку середнього значення для серії незалежних послідовних аналізів п'яти різних аліквот однієї проби.

В дослідах використовувались стандартні первинні простагландини (ПГЕ та ПГФ) та 19-ОН простагландини фірми "Santa Cruz Biotechnology Inc." (США).

В дослідженні приймали участь донори № 1, 4, 9, 10, у яких об'єм еякуляту перевищував 6 мл. Морфокінетичні характеристики їх сперми подані в табл. 1. Всі донори мали концентрацію сперматозоїдів в еякуляті в діапазоні 44-156 млн. кл/мл, причому їх життєздатність була в межах 69-94 %, а рухливість 66-91 %. Сперматозоїди мали добрі кінетичні характеристики, оскільки поступальна рухливість дорівнювала 62-82 %, а прискорена лінійна рухливість - 29-42 %. До того ж кількість аномальних сперматозоїдів в еякуляті не перевищувала рівня 22 %. Кількісний вміст простагландинів різних серій та груп в сім'яній рідині аналізували газохромато-

мас-спектрометрично одночасно як в зразках свіжозібраної сперми, так і в зразках сперми, що зберігалася при -193° С в рідкому азоті або при -20° С в морозильній камері.

Як видно з табл. 2, в свіжій спермі ідентифіковано 4 групи простагландинів - ПГЕ, ПГФ, 19-ОН ПГЕ та 19-ОН ПГФ, причому кожна група містила принаймні простагландини першої та другої серії, оскільки ПГ третьої серії ми не визначали за браком стандартів. Точно такий же розподіл ПГ спостерігався і в зразках сперми, що зберігалась при -193° С, тоді як в разі зберігання при температурі -20° С з'являлись артефактні $ПГА_1$, $ПГА_2$, $ПГВ_1$ та $ПГВ_2$. Крім того, це супроводжувалось одночасно появою 19-ОН $ПГА_1$, 19-ОН $ПГА_2$, 19-ОН $ПГВ_1$ та 19-ОН $ПГВ_2$. Слід відзначити, що утворення пулу ПГА та ПГВ поєднувалось зі зменшенням концентрації ПГЕ. ПГФ за таких умов кількісно не зменшувались. Паралельно відбувалась трансформація 19-ОН ПГЕ в 19-ОН ПГА та 19-ОН ПГВ, яка проходила нерівномірно, що призводило до більш вираженого утворення ПГВ та 19-ОН ПГВ порівняно з групами А-простагландинів.

На підставі проведеного дослідження можна зробити висновок, що кріозберігання сперми в рідкому азоті при -193° С ніяким чином не позначається на кількісних характеристиках вмісту в ній простагландинів різних груп та серій, що створює передумови для проведення серійних аналізів сперми чоловіків з різних регіонів України газохромато-мас-спектрометричним методом з диференційованою ідентифікацією окремих груп і серій простагландинів в сім'яній рідині.

Приклад 2.

В цьому дослідженні приймали участь донори № 8 та 10, які здавали сперму на аналіз шляхом мастурбації у чисті контейнери після 4-х днів статевого утримання. Морфокінетичні характеристики сперми обох донорів наведені у табл. 1. Сперму розріджували при кімнатній температурі протягом 40 хв., після чого кожний зразок сперми поділяли на 2 рівні частини. Кожну частину використовували для екстракції ПГ у присутності доданої внутрішньої радіоактивності у вигляді [^{3}H] $ПГФ_{2\alpha}$ або [^{3}H] $ПГЕ_2$.

Використовували $ПГЕ_2$ [5, 6, 8, 11, 12, 14, 15-^{3}H (N)] та $ПГФ_{2\alpha}$ [5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15 ^{3}H (N)] з питомою радіоактивністю 5,55-8,88 ТБк/ммоль фірми "Perkin Elmer".

Мітку вводили шляхом мікроін'єкції 50 мкл стокового розчину у пробу сперми чи сім'яної рідини перед кожним етапом екстракції ПГ. Підрахунок радіоактивності екстракту проводили за допомогою сцинтиляційної рідини ЖС-8 на сцинтиляційному лічильнику „Ізокап-300". Втрати радіоактивності на кожному етапі наводили у процентах від початкової кількості. Результати дослідження представлені в табл. 4. Як бачимо, при розділенні сперми на сперматозоїди та сім'яну рідину за протоколом прототипу зазвичай втрачається 27 % $ПГФ_{2\alpha}$ та 34 % $ПГЕ_2$, відповідно. В той же час, за запропонованим нами протоколом втрати на етапі центрифугування були значно меншими, відповідно 1,0 % та 2,0 %. При ультрафільтрації пряма ін'єкція сім'яної рідини в контейнер приладу дозволяє на відміну від введення проби на підкладці (прототип) також запобігти суттєвим втратам ПГ, що становили 18 % для $ПГФ_{2\alpha}$ та 21 % для $ПГЕ_2$, і довести їх до 1 % $ПГФ_{2\alpha}$ та 0 для $ПГЕ_2$. При хімічній екстракції ПГ лише етилацетатом при pH 3 втрачалось 36 % $ПГФ_{2a}$ та 27 % $ПГЕ_2$, тоді як у разі застосування послідовної екстракції діетиловим ефіром при pH 3 та етилацетатом при pH 4 втрати не перевищували 1 %.

Якщо підрахувати загальні втрати ПГ протягом багатостадійної екстракції ПГ перед початком хроматографічного аналізу, то виявляється, що вони можуть складати до 50-55 % початкової кількості за протоколом прототипу. Цей недолік вдається подолати шляхом оптимізації протоколу екстракції і довести загальні втрати ПГ на підготовчому етапі до 4-6 %.

Приклад 3.

В цьому дослідженні взяли участь донори сперми № 2, 3, 6, 7. Морфокінетичні характеристики їх зразків сперми надані в табл. 1. Всі спермодонори були фертильними, оскільки вже мали принаймні одну дитину, а зразки їх сперми повністю задовольняли критеріям ВООЗ. Так, концентрація сперматозоїдів в еякуляті знаходилась в межах 80-180 кл/мл, об'єм еякуляту був не менший, ніж 4,2 мл (4,2-5,3 мл). Крім того, життєздатність сперматозоїдів коливалась від 77 % до 92 %, тоді як рухливість сперматозоїдів дорівнювала 70-85 %. Більшість сперматозоїдів знаходились в стані поступального руху, причому кількість таких, що прискорено і прямолінійно рухались перевищувала 28 %. Одночасно, в спермі містилось не більше 15 % аномальних сперматозоїдів. Всі ці дані вказували на наявність достатньо високого фертилізаційного потенціалу у всіх без винятку донорів сперми.

Донори здавали сперму після 3-5 днів статевого утримання шляхом мастурбації у чисті скляні контейнери. Сперму розріджували протягом 40 хв. при кімнатній температурі (t=20 °С). Розріджену сперму кожного донора поділяли на 2 рівні частини по 2 мл кожна. Першу частину використовували для кількісного визначення ПГ за протоколом прототипу з тією лише відмінністю, що газове хроматографічне розділення екстрагованих ПГ проводили на капілярній колонці 30 м×0,25 м, заповненій DB 1701, а не на колонці 4 м×2,5 мм, що була заповнена 3 %

Dexsil 300 на носії Gas-Chrom (100-200 меш). Це було пов'язано з технічними труднощами і відсутністю такої колонки. Другу частину зразка сперми обробляли і аналізували за запропонованим протоколом.

Первинну обробку зразків сперми та підготовку їх до газохроматографічного аналізу, поєднаного з мас-спектрометричним визначенням речовин, здійснювали так, як це було детально описано в прикладі 1 та 2. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою парного критерію Стьюдента, при p=0,95.

Як бачимо з табл. 4, рівні простагландинів $ПГЕ_1$ та $ПГЕ_2$ при визначенні за запропонованим протоколом відрізняються на статистично достовірному рівні від тих значень, що вдається отримати за протоколом прототипу. Аналогічні спостереження можна зробити щодо 19-ОН $ПГЕ_1$ та 19-ОН $ПГЕ_2$. В той же час концентрація $ПГФ_{1\alpha}$ та $ПГФ_{2\alpha}$ при визначенні двома різними методами не дає статистично достовірних розбіжностей, хоча запропонований метод дає дещо вищі показники цих простагландинів, приблизно на 24-30 %.

Середні значення 19-ОН $ПГФ_{1\alpha}$ та 19-ОН $ПГФ_{2\alpha}$ при визначенні новим методом були також на 12-16 % вищі, ніж при визначенні за протоколом прототипу.

Таким чином, удосконалення процедури первинної обробки сперми та екстракції ПГ сім'яної рідини дало змогу покращити результати газохромато-мас-спектрометричного визначення різних груп та серій ПГ в спермі на кількісному рівні.

Таблиця 1

Результати цитологічного аналізу морфокінетичних параметрів сперматозоїдів з еякулятів чоловіків-донорів сперми, що приймали участь у дослідженні

Донор №	Концентрація сперматозоїдів ($x10^6$ кл/мл)	Загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті	Об'єм еякуляту	Життєздатність сперматозоїдів	Рухливість сперматозоїдів	Поступальна рухливість сперматозоїдів	Прискорена лінійна рухливість сперматозоїдів	Наявність аномальних сперматозоїдів
		$x10^6$ кл	мл	(% загальної кількості)	(% загальної кількості)	(% загальної кількості)	(% загальної кількості)	(% загальної кількості)
1	156	1029,6	(6,6)	88	80	70	37	5
2	87	438,6	(5,1)	92	85	78	28	7
3	122	512,4	(4,2)	77	77	69	31	12
4	44	272,8	(6,2)	84	83	82	42	9
5	59	596,7	(6,7)	94	91	71	29	4
6	80	384	(4,8)	79	70	67	34	15
7	180	954	(5,3)	88	78	75	30	10
8	119	487,9	(4,1)	90	89	83	27	3
9	126	907,2	(7,2)	69	66	62	31	22
10	77	377,3	(4,9)	95	87	79	36	8

Таблиця 2

Вплив умов зберігання на кількісний та якісний вміст простагландинів різних груп та їх 19-гідроксильованих похідних у спермі чоловіків, які приймали участь у дослідженні

	Донор											
	1			4			5			9		
	Сперма											
Речовина	Свіжа* мкг/мл	-193 °C† мкг/мл	-20 °C‡ мкг/мл	Свіжа мкг/мл	-193 °C* мкг/мл	-20 °C† мкг/мл	Свіжа мкг/мл	-193 °C мкг/мл	-20 °C мкг/мл	Свіжа мкг/мл	-193 °C мкг/мл	-20 °C мкг/мл
$ПГЕ_1$	59±5	59±3	37±6**	100±6	102±5	68±8	96±7	94±5	73±7	62±4	62±3	51±6**
$ПГЕ_2$	100±3	101±2	84±4**	119±7	120±4	97±4	89±6	87±7	75±4	68±6	68±7	47±4**
$ПГФ_{1\alpha}$	0,4±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1	1,6±0,2	1,5±0,3	1,7±0,3	2,0±0,3	2,0±0,2	2,0±0,2	0,8±0,1	0,8±0,2	0,8±0,2
$ПГФ_{2\alpha}$	0,8±0,2	0,8±0,1	0,8±0,3	2,5±0,5	2,3±0,6	2,3±0,4	3,5±0,3	3,4±0,4	3,4±0,3	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,3
$ПГА_1$	-	-	7±3**	-	-	11±3**	-	-	8±3**	-	-	3±1**
$ПГА_2$	-	-	6±2**	-	-	5±2**	-	-	5±2**	-	-	7±1**
$ПГВ_1$	-	-	15±3**	-	-	22±4**	-	-	15±2**	-	-	8±3**
$ПГВ_2$	-	-	9±2**	-	-	17±3**	-	-	19±3 * *	-	-	14±2**

Продовження таблиці 2

Вплив умов зберігання на кількісний та якісний вміст простагландинів різних груп та їх 19-гідроксильованих похідних у спермі чоловіків, які приймали участь у дослідженні

	Донор											
	1			4			5			9		
19ОН $ПГЕ_1$	290±9	292±11	262±15**	510±16	512±13	425±31**	415±7	418±8	360±13**	300±18	295±12	254±12**
19ОН $ПГЕ_2$	533±25	533±21	483±35**	590±11	592±8	505±27**	545±12	549±11	472±9**	436±11	429±10	389±16**
19ОН $ПГФ_{1\alpha}$	15±3	15±2	15±3	23±5	23±6	23±3	20±4	21±3	22±2	37±7	39±2	37±3
19ОН $ПГФ_{2\alpha}$	23±5	23±4	23±4	35±4	35±5	35±7	21±3	20±5	21±1	23±3	25±2	23±5
19ОН $ПГА_1$	-	-	11±3**	-	-	22±4**	-	-	14±2**	-	-	8±1**
19ОН $ПГА_2$	-	-	12±2**	-	-	17±28**	-	-	19±3**	-	-	5±1**
19ОН $ПГВ_1$	-	-	19±2**	-	-	63±8**	-	-	41±5**	-	-	38±6**
19ОН $ПГВ_2$	-	-	68±5**	-	-	68±9**	-	-	54±7**	-	-	36±8**

* - сперма використовувалась зразу після розрідження протягом 1 години з моменту еякуляції
† - сперма зберігалась у рідкому азоті 6 місяців;
‡ - сперма зберігалась у морозильній камері при -20 °С півроку
** - наявність статистично достовірних відмінностей при $p \leq 0,05$ з результатами для свіжої та кріоконсервованої у рідкому азоті сперми

Таблиця 3

Аналіз втрат $^3H(ПГФ_{2\alpha})$ та ^3H(19-ОН $ПГФ_{2\alpha}$), що відбувались у багатостадійному процесі екстракції простагландинів зі сперми

Етап №	Назва етапу	Втрати $^3H(ПГФ_{2a})$, %		Втрати $^3H(ПГЕ)$, %	
		Н*	П**	Н*	П**
1	Центрифугування				
1а	5 хв при 17000g (1 раз)	-	27±1	-	34±1
1б	15 хв при 3000g (двічі)	1,0±0,1	-	2,0±0,3	-
2	Ультрафільтрація				
2а	Ін'єкція проби на підкладці	-	18±1	-	21±1
2б	Пряма ін'єкція проби	1±0,1	-	0	-
3	Екстракція хімічним розчинником				
3а	Етилацетат при pH 3 (1 раз)	-	36±3	-	27±2
3б	Діетиловий ефір (pH 3) + етилацетат (pH 4) (послідовно, 1 раз)	1±0,2		0	

* - протокол, що пропонується в заявці;
** - протокол прототипу

Таблиця 4

Вплив процедури екстракції простагландинів на кількісне визначення вмісту простагландинів та їх 19 гідроксильованих похідних у свіжій спермі фертильних чоловіків, що брали участь у дослідженні

Речовина	Концентрація ПГ в спермі (мкг/мл)	
	За новим протоколом	За протоколом прототипу
$ПГЕ_1$	113,0±19,2	79,8±16,2*
$ПГЕ_2$	96,7±15,3	58,7±11,5*
$ПГФ_{1\alpha}$	1,7±0,5	1,3±0,з
$ПГФ_{2\alpha}$	3,1±0,4	2,5±0,4
19ОН $ПГЕ_1$	650,5±40,3	512,7±32,1*
19ОН $ПГЕ_2$	722,3±51,8	462,3±40,8*
19ОН $ПГФ_{1\alpha}$	12,1±3,2	10,8±2,6
19ОН $ПГФ_{2\alpha}$	25,2±4,6	21,7±3,9

* - статистично достовірні розбіжності при $p \leq 0,05$ з аналогічними результатами за запропонованим (новим) протокол

Джерела інформації:

1. E.W. Horton, C.J. Tompson. Thin-layer chromatography and bioassay of prostaglandins in extracts of semen and tissues of the male reproductive tract. - Brit. J. Pharmacol.-1964. - Vol. 22. - P. 183-188.

2. R. Michael, N. Younan, A. Guindi, A. Abadir. Human seminal prostaglandins and male fertility. - Proc. West. Pharmacol. Soc.-2001. - Vol. 44. - P. 141-143.

3. K. Gerozissis, F. Dray. Radioimmunoassay of prostaglandins in the semen of fertile man. - J. Reprod. Fert.-1981. - Vol. 61. - P. 487-490.

4. K. Svanborg, M. Bydgeman, P. Eneroth, E. Bendvold. Quantification of PGs in human seminal fluids. - Prostaglan.-1982. - Vol. 24. - P. 363-375.

5. P.L. Taylor, R.W. Kelly. The occurrence of 19-hydroxy F prostaglandins in human semen. - FEBS letters.-1975. - Vol. 57, No 1. - P. 22-25.

6. K. Gerozissis, P. Jouannet, J.C. Soufir, F. Dray. Origin of prostaglandins in human semen. - J. Reprod. Fert.-1982. - Vol. 65. - P. 401-404.

7. J.M. Tusell, E. Gelpi. Prostaglandins E and F, and 19-hydroxylated E and F (series I and II) in semen of fertile men. Gas and Liquid chromatographic separation with selected ion detection. - J. Chromatogr.-1980. - Vol. 181. -P. 295-310.

8. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th editor. - Geneva: WHO Press, 2010.-286 p.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб диференційованого визначення основних простагландинів (ПГ) сперми в серіях еякулятів чоловіків з різних регіонів України об'єднаним газохроматографічно-мас-спектрометричним методом, що включає збір сперми шляхом мастурбації в чисті скляні контейнери, її заморожування та кріозберігання у рідкому азоті з метою накопичення достатньої кількості зразків та здійснення транспортування до місця проведення серійних аналізів, який **відрізняється** тим, що спочатку здійснюється розрідження сперми 40-60 хв. при 20 °С, а очищення сім'яної рідини від сперматозоїдів та супутніх клітин проводять центрифугуванням 15 хв. при 3000 g, а від високомолекулярних білків - ультрафільтрацією на фільтрі PLAC під тиском 8,0 кг/см^2; після чого з очищеної сім'яної рідини екстрагують ПГЕ та ПГФ диметиловим ефіром при pH 3, а їх 19-ОН ПГЕ та ПГФ етилацетатом при pH 4, а після хімічної трансформації ПГ та 19-ОН ПГ у триметилсилілові (ТМС) похідні [$ПГ(ТМС)_4$; $19\text{-}ОН(ТМС)_5$] сумішшю N_1O-біс(триметилсиліл)флуорацетаміду та піперидину (1:1) при 60 °С 30 хв. проводиться кількісна газохромато-мас-спектрометрія з використанням капілярної колонки 30 м × 0,25 мм, наповненої DB1701, маркерних іонів (m/e$^-$:479, 481, 483, 485) та дейтерованого внутрішнього стандарту [$ПГФ_{2\alpha}Д4$].

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601