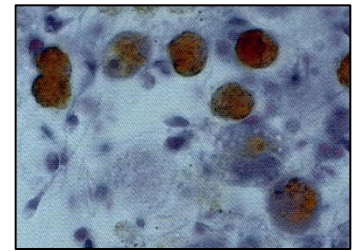
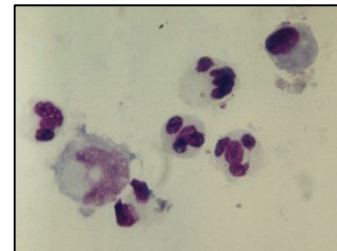
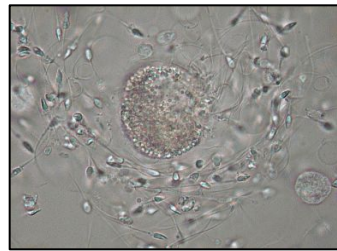
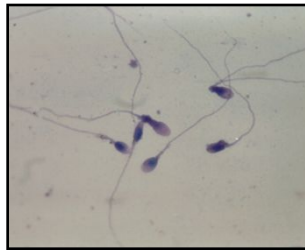
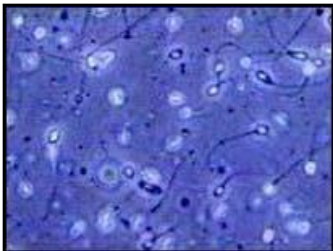


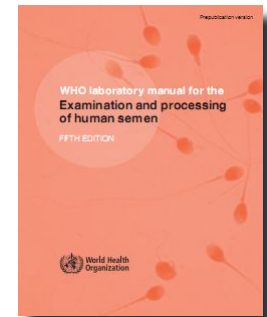
# Лабораторные методы исследования эякулята

Липатова Н.А., к.м.н.,  
лаборатория «Мобил Медикал Лаб»



# Требования к исследованиям:

- Стандартизация
- Качество и скорость выполнения
- Полнота обследования
- Минимизация затрат



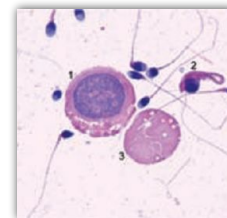
## Задачи лабораторной диагностики при исследовании репродуктивной функции мужчины:

- Помощь в постановке диагноза
- Помощь определения тактики лечения: назначение или отказ от лечения в пользу ВРТ или альтернативных способов достижения отцовства
- Мониторинг терапии

# Задачи исследования эякулята

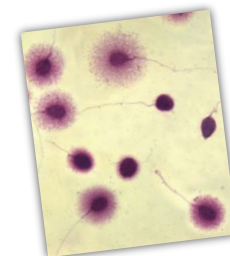
## Стандартное

- Оценка наличия и количества сперматозоидов
- Оценка их подвижности
- Оценка их морфологии
- Свойства семенной жидкости (объем, вязкость, pH и др.)
- Биохимические маркеры функции дополнительных половых желез
- Наличие аутоиммунных реакций против сперматозоидов



## Специальное:

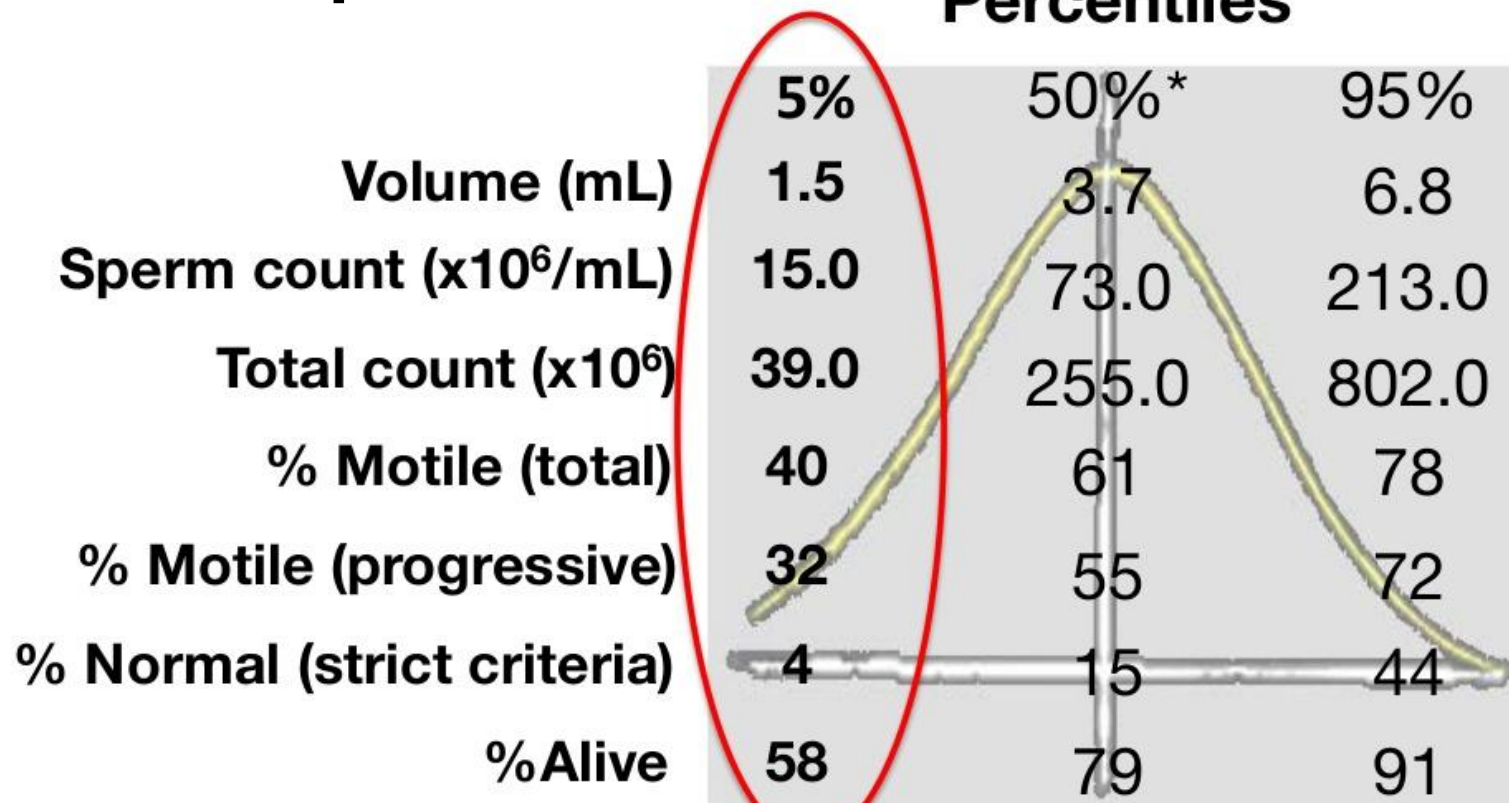
- Акросомная реакция,
- конденсация хроматина,
- фрагментация ДНК
- Определение активных форм кислорода



# Что такое – нормальная спермограмма?

Характеристики спермы	ВОЗ, 1980	ВОЗ, 1987	ВОЗ, 1992	ВОЗ, 1999	ВОЗ, 2010
Объем, мл	НО	$\geq 2$	$\geq 2$	$\geq 2$	1.5
Концентрация сперматозоидов, $10^6$ /мл	20–200	$\geq 20$	$\geq 20$	$\geq 20$	15
Общее количество сперматозоидов, $10^6$	НО	$\geq 40$	$\geq 40$	$\geq 40$	39
Общая подвижность, % подвижных	$\geq 60$	$\geq 50$	$\geq 50$	$\geq 50$	40
Прогрессивно-подвижные, a+b	$\geq 25$	$\geq 25\%$	$\geq 25\%$ (a)	$\geq 25\%$ (a)	32% (a+b)
Жизнеспособность, % живых	НО	$\geq 50$	$\geq 75$	$\geq 75$	58
Морфология, % нормальных форм	80.5	$\geq 50$	$\geq 30$ (d)	(14)	4 (f)
Количество лейкоцитов, 10 в 6/мл	<4.7	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0

# На основании чего появились новые стандарты качества спермы по ВОЗ-2010?

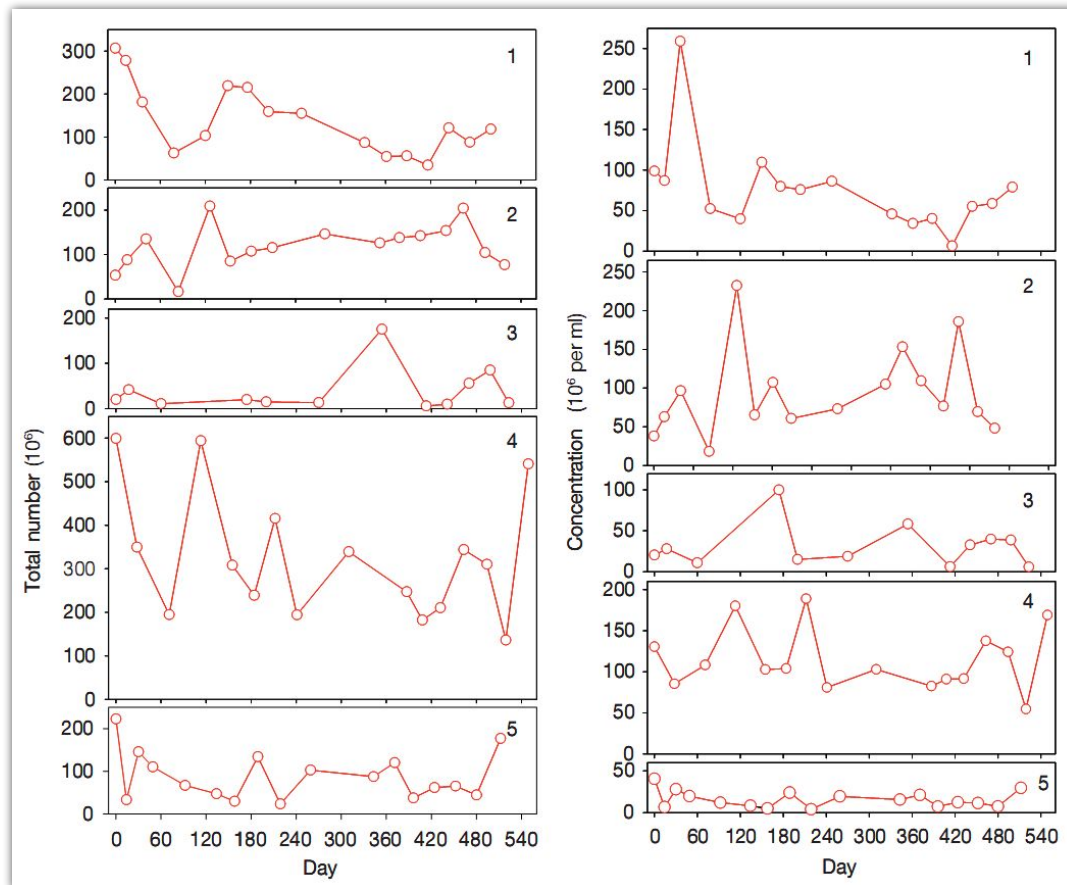


# СТАНДАРТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

**Исследование эякулята проводят дважды с интервалом не менее 7 дней и не более 3 недель. Если результаты значительно различаются проводится дополнительный анализ**

**Анализировать образец необходимо в течение часа после получения**

**При низкой концентрации поступательно подвижных спермиев повторный образец исследуют как можно быстрее (со временем подвижность снижается)**



Исследуя только один образец трудно оценить реальное качество спермы. Для получения достоверных результатов необходимо оценить два или три образца.

*Berman et al., 1996, Carlsen et al. 2004, castila et al., 2006, Kell et al., 2006*

При повторном исследовании эякулята мужчин, которые имели отклонения в параметрах спермограммы при первом исследовании, в значительном количестве случаев были выявлены более высокие показатели по сравнению с первым анализом.

*Baker, Kovacs, 1985; Esteves, Chan, 2015 и др.*



## Сбор эякулята для диагностических или исследовательских целей

- Образец следует получать путем мастурбации и семяизвержения в чистый, с широким горлом контейнер из стекла или пластика, проверенного на нетоксичность для сперматозоидов (см. Бокс 2.1).
- Контейнер с образцом следует держать при температуре от 20° С до 37° С для того, чтобы избежать резких перепадов, которые могут повредить сперматозоиды после эякуляции. Контейнер должен быть промаркирован фамилией пациента и идентификационным номером, а также датой и временем сбора образца.
- Контейнер с образцом помещают на стол или в инкубатор (37° С) для разжижения семени.
- Следует отметить в отчете, если образец собран не полностью, особенно, если первая, богатая сперматозоидами порция, была утеряна. Если образец собран не полностью, второй образец следует собирать после периода полового воздержания от 2 до 7 дней.

### *В первые 5 мин после получения:*

- Размещение контейнера с образцом в инкубатор при 37° С для разжижения.

Неоднородность можно снизить многократным (6–10 раз) аккуратным пипетированием эякулята через иглу с тупым концом диаметром G18 (внутренний диаметр 0,84 мм) или G19 (внутренний диаметр 0,69 мм), прикрепленную к шприцу.

Добавление бромелайна, протеолитического фермента (ЕС 3.4.22.32), может способствовать разжижению (см. Бокс 2.2.).

# Физические параметры

- **Объем, снижение:**
- Ретроградная эякуляция
- Обструкция семявыносящих путей
- Агенезия семенных пузырьков
- Низкий уровень андрогенов
- Нарушение преаналитики

## pH

- Если в образце с азооспермией  $\text{pH} < 7$ , можно предполагать обструкцию или врожденное двустороннее отсутствие семявыносящих протоков

# Микроскопия световая

## Нативный препарат:

подвижность и агглютинация сперматозоидов, а также наличие других клеточных элементов и жизнеспособность сперматозоидов;

## Гемоцитометр:

концентрация,

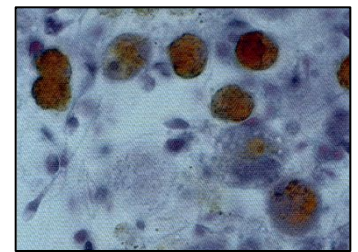
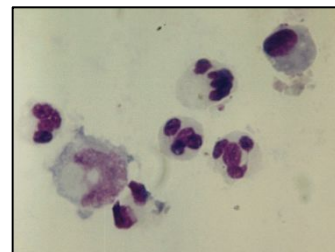
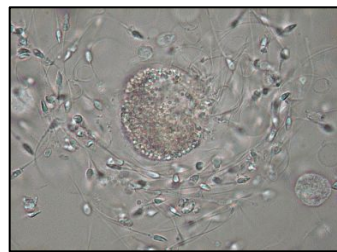
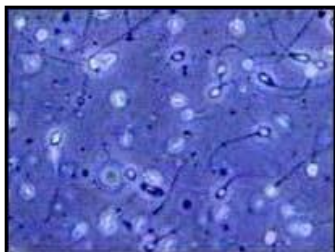
## Фиксированный окрашенный препарат:

морфологическая классификация сперматозоидов;

Подсчет количества лейкоцитов;

## МАР-тест

выявляется наличие антиспермальных антител.



**Для просмотра наносят 10 мкл  
эякулята на предметное стекло и  
накрывают предметным 22x22**

**Стабилизация препарата происходит  
в течение 1 мин**

**Подсчитывают 200 сперматозоидов  
не менее чем в 5 полях зрения**

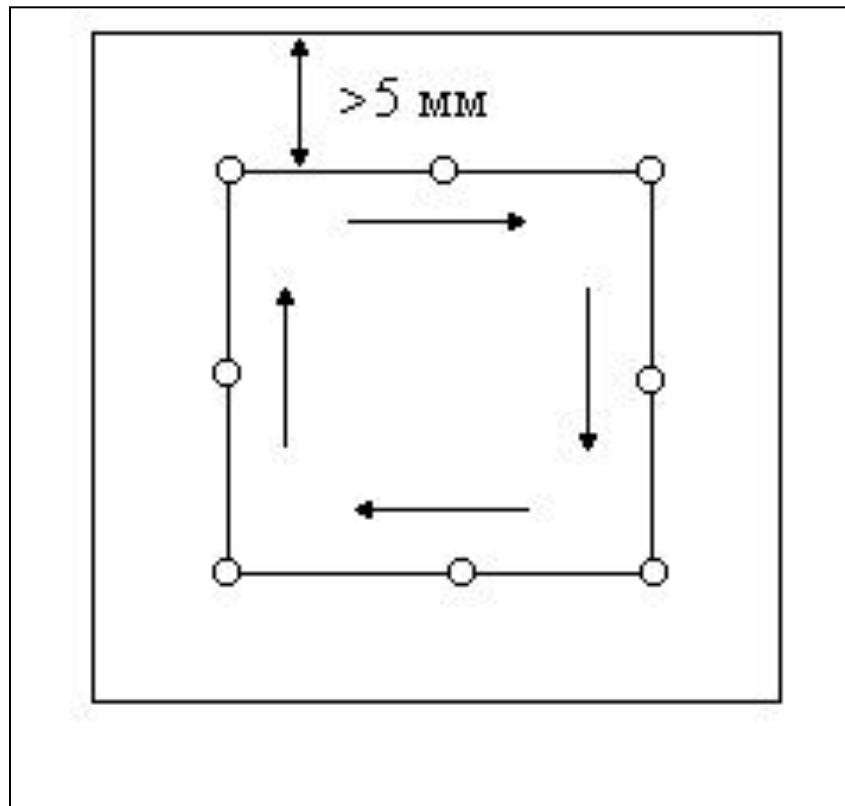
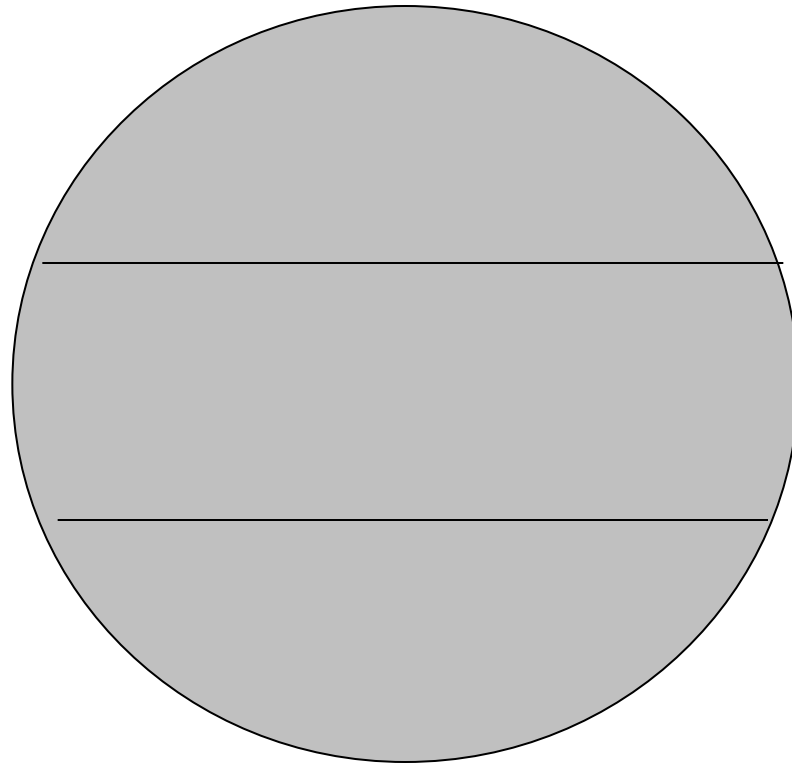


Схема просмотра препарата



Подсчет подвижности  
сперматозоидов

## **Критерии подвижности сперматозоидов :**

- **поступательное движение**  
**( $\geq 20-25$  мкм/сек, что приблизительно соответствует длине 5 головок или половине длины хвоста нормального сперматозоида);**
- **непоступательное (колебательное, манежное),**
- **неподвижные сперматозоиды.**

# Жизнеспособность

## Окраска эозином.

- Реактивы: Эозин Y (К или желтый водорастворимый) - раствор 5 г/л на физиологическом растворе
- На предметном стекле смешать каплю хорошо размешенного эякулята с такой же по размеру каплей раствора эозина и покрыть препарат покровным стеклом. Исследовать препарат через 30 сек при увеличении  $\times 400$ .
- Оценку полученных результатов провести немедленно. Живые сперматозоиды бесцветные (белые), мертвые сперматозоиды окрашиваются в цвет красителя (оранжевые).



## Окраска эозином-нигрозином

Реактивы: Эозин Y – 3% водный раствор, нигрозин – 10% раствор.

- на предметное стекло нанести каплю хорошо размешенного эякулята,
- рядом поместить 2 капли 3% водного раствора эозина,
- каплю спермы тщательно перемешивают стеклянной палочкой с каплями эозина и выдержать 30 сек.,
- добавить 3 капли 10% водного раствора нигрозина, выдержать 30 сек.;
- сделать мазки, высушить и исследовать под иммерсией;
- сосчитать 100 окрашенных и неокрашенных сперматозоидов и определить процентное соотношение живых и мертвых.

**Концентрацию сперматозоидов подсчитывают в гемоцитометре, сделав предварительно разведение эякулята**

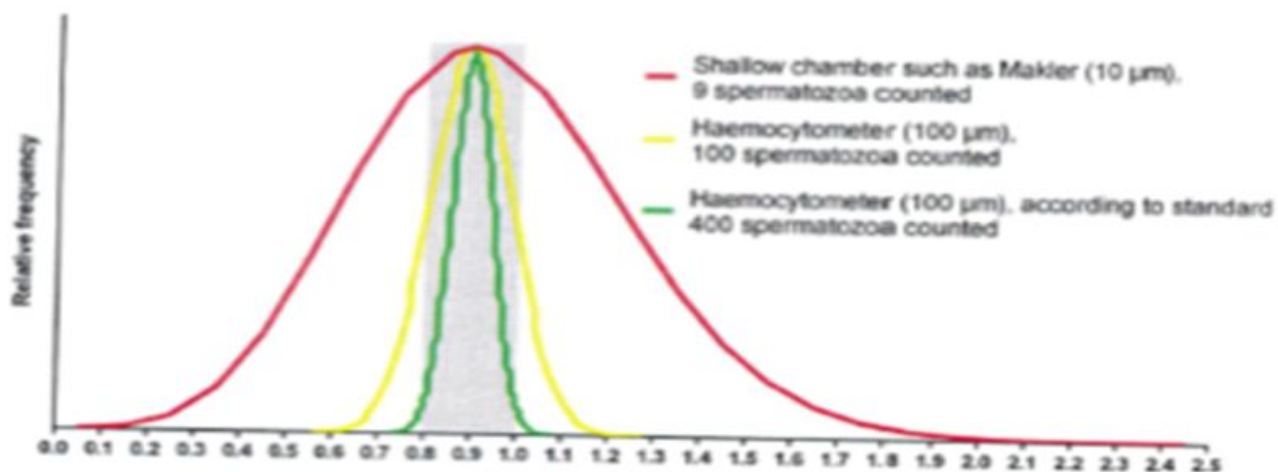
**Для разведения на 1 л физ. р-ра:**

- 10 мл 35% р-ра формалина**
- 0,25 метиленового синего или**
- 5 мл насыщенного водного р-ра генциан-виолета**

## ‘How to count sperm properly’: checklist for acceptability of studies based on human semen analysis

Lars Björndahl<sup>1,\*</sup>, Christopher L.R. Barratt<sup>2</sup>, David Mortimer<sup>3</sup>, and  
Pierre Jouannet<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centre for Andrology and Sexual Medicine, Karolinska University Hospital and Karolinska Institutet, Huddinge C2:94, S-141 86 Stockholm, Sweden <sup>2</sup>Reproductive Medicine, University of Dundee, Dundee, UK <sup>3</sup>Oozoa Biomedical Inc., Vancouver, BC, Canada <sup>4</sup>Université Paris Descartes, Paris, France



**X =**

**(n x разведение x  
250x1000)/к-во**

**ПОДСЧИТАННЫХ КВАДРАТОВ**

**Для подсчета сперматозоидов:**

$$X = (n \times \text{разведение} \times 250 \times 1000) / 5$$

**Для разведения в 20 раз**

**$n \times 1\,000\,000$**

- Клетки эякулята кроме сперматозоидов в совокупности обозначают, как «круглые клетки».
- Их количество не должно превышать  $3 \cdot 10^6$ /мл спермы
- Количество лейкоцитов не должно превышать  $10^6$ /мл.

# Для подсчета лейкоцитов

$$X = (n \times \text{разведение} \times 250 \times 1000) / 40$$

Для разведения в 20 раз  
 $n \times 125000$

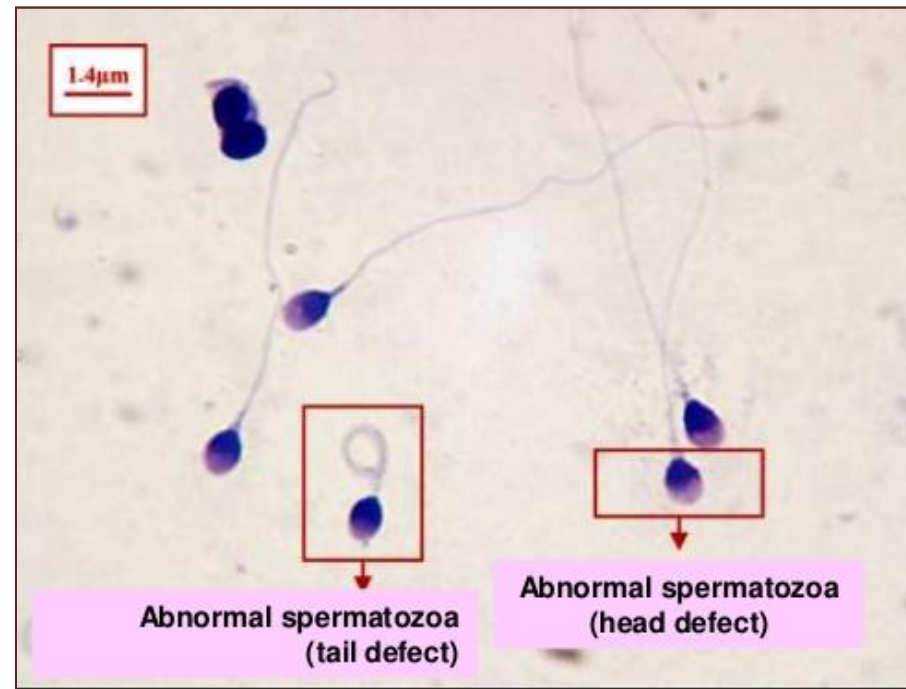
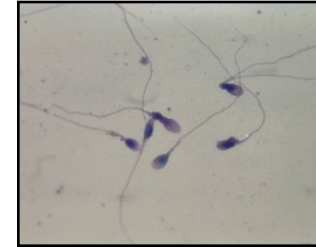
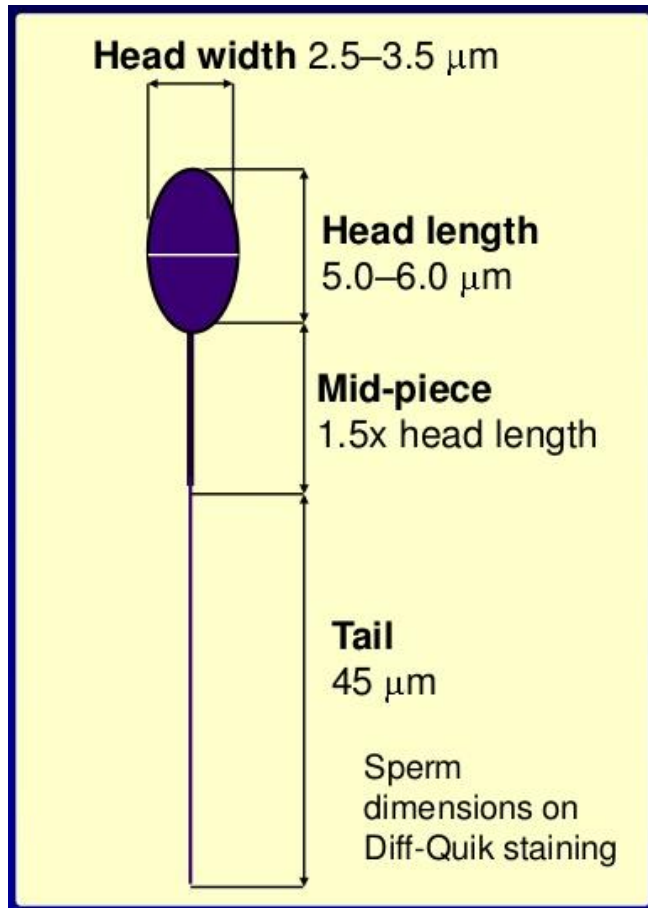
# Окраска

## □ по Папаниколау

- метод быстрого окрашивания «**Diff-Quik**» (США)
- **Spermatic Stain** (фирма Ferti Pro, Бельгия).
- по **Романовскому-Гимза** с предварительной фиксацией мазков метиловым или этиловым спиртом;
- по **Паппенгейму** с фиксацией мазков фиксатором-красителем типа **Май-Грюнвальд** и последующей доокраской препаратов рабочим раствором краски Романовского-Гимза
- **По Лейшману**



# Морфология сперматозоидов по строгим критериям

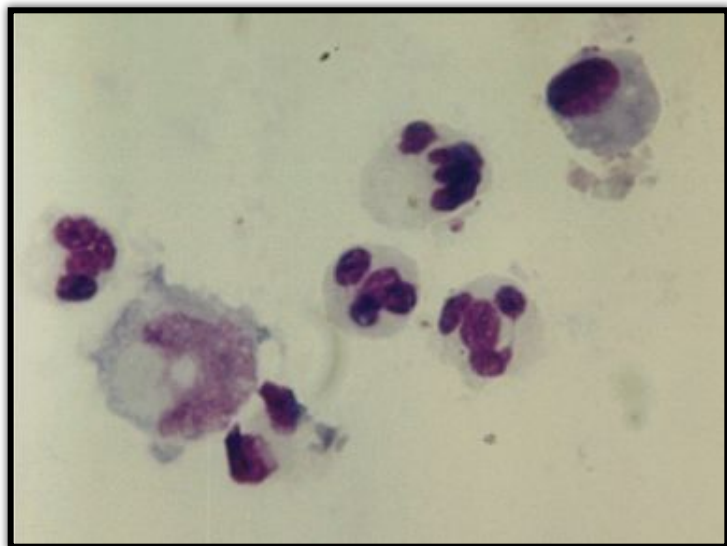


# Индекс тератозооспермии (ИТЗ) или индекс множественных аномалий (ИМА)

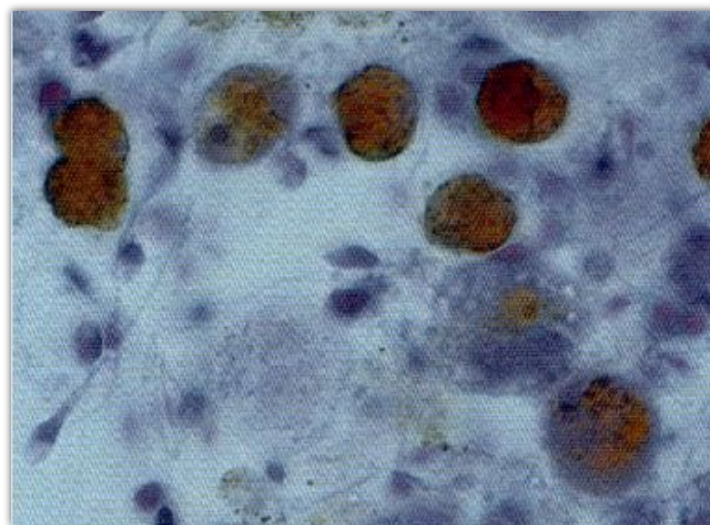
- **ИТЗ = число дефектов, деленное на число патологических сперматозоидов.**
- **ИТЗ 1,00 (каждый патологический сперматозоид имеет только 1 дефект) до 3,00 (каждый патологический сперматозоид имеет дефекты головки, средней части и хвоста).**
- Имеются данные, что при ИТЗ **более 1,6** происходит снижение частоты наступления беременности.

# Методы выявления лейкоцитов

- Подсчет «круглых» клеток в гемоцитометре.  
Пересчет лейкоцитов по окрашенному мазку.  
Результат количественный, млн/мл



- Дополнительный метод окрашивания на миелопероксидазу



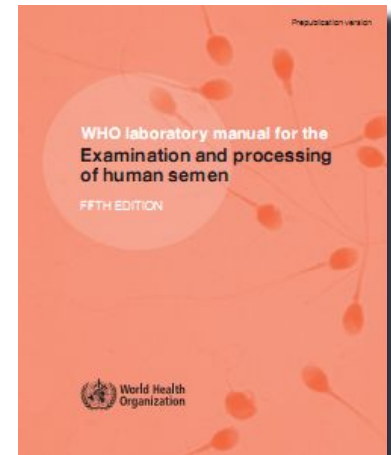
# СПЕЦИАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все еще четко не определены характеристики эякулята присущие исключительно бесплодным пациентам и не характерные для фертильных, так как до **40%** бесплодных мужчин имеют нормальные показатели спермограммы.

*Moghissi et al., 1983; Guzik et al., 2001; van der Steeg et al., 2011; Belloc et al., 2014; Esteves, Chan, 2015 и др.*

Около **30%** пациентов с идиопатическим бесплодием имеют нарушения, которые, могут быть установлены исключительно с помощью функциональных тестов, включая измерение фрагментации ДНК, конденсации хроматина, оксидативного стресса и антиспермальных антител (АСАТ).

*Agarwal et al., 2008; 2016; Esteves et al., 2014, 2015; Pourmasumi et al., 2017; Rogenhofner et al., 2017 и другие*



# Антиспермальные антитела (АСАТ/АSА)

- ▶ нарушают функциональную целостность мембраны сперматозоидов
- ▶ препятствуют продвижению сперматозоидов и их пенетрации через цервикальную слизь
- ▶ блокируют рецепторные участки на головке сперматозоида, ответственные за связывание с блестящей оболочкой яйцеклетки
- ▶ нарушают акросомную реакцию
- ▶ оказывают повреждающее действие на функцию предстательной железы, в частности на простасомы, органеллы, секретируемые ацинарными клетками предстательной железы.

# Методы определения АСАТ

- ▶ Смешанная реакция агглютинации/ SpermMar IgG, IgA test

Прямой тест : на подвижных сперматозоидах

Непрямой тест: в сыворотке или цервикальной слизи

- ▶ Иммунобид/IBT

на подвижных

отмытых сперматозоидах

# Биохимические исследования эякулята

**Фруктоза** (семенные пузырьки) обеспечивает энергетический баланс, поддержание обмена веществ и подвижности сперматозоидов. Существенное снижение - при отсутствии семенных пузырьков, при муковисцерозе; умеренное снижение имеет место при андрогендефиците

**Лимонная кислота** (простата) – используется в биосинтезе жирных кислот, ацетилировании гистонов, а также стимулирует емкость сперматозоидов и др.

Низкую концентрацию лимонной кислоты находят у мужчин с воспалением генитальной сферы.

**Цинк** (простата, сперматозоиды) - мембранстабилизирующий фактор антиоксидант, играет ключевую роль в процессе протаминации сперматозоидов.

**Альфа-гликозидаза** - нейтральная изоформа фермента является основным маркером функциональной способности придатков яичек (эпидидимиса).

## Биохимические исследования эякулята, референтные пределы

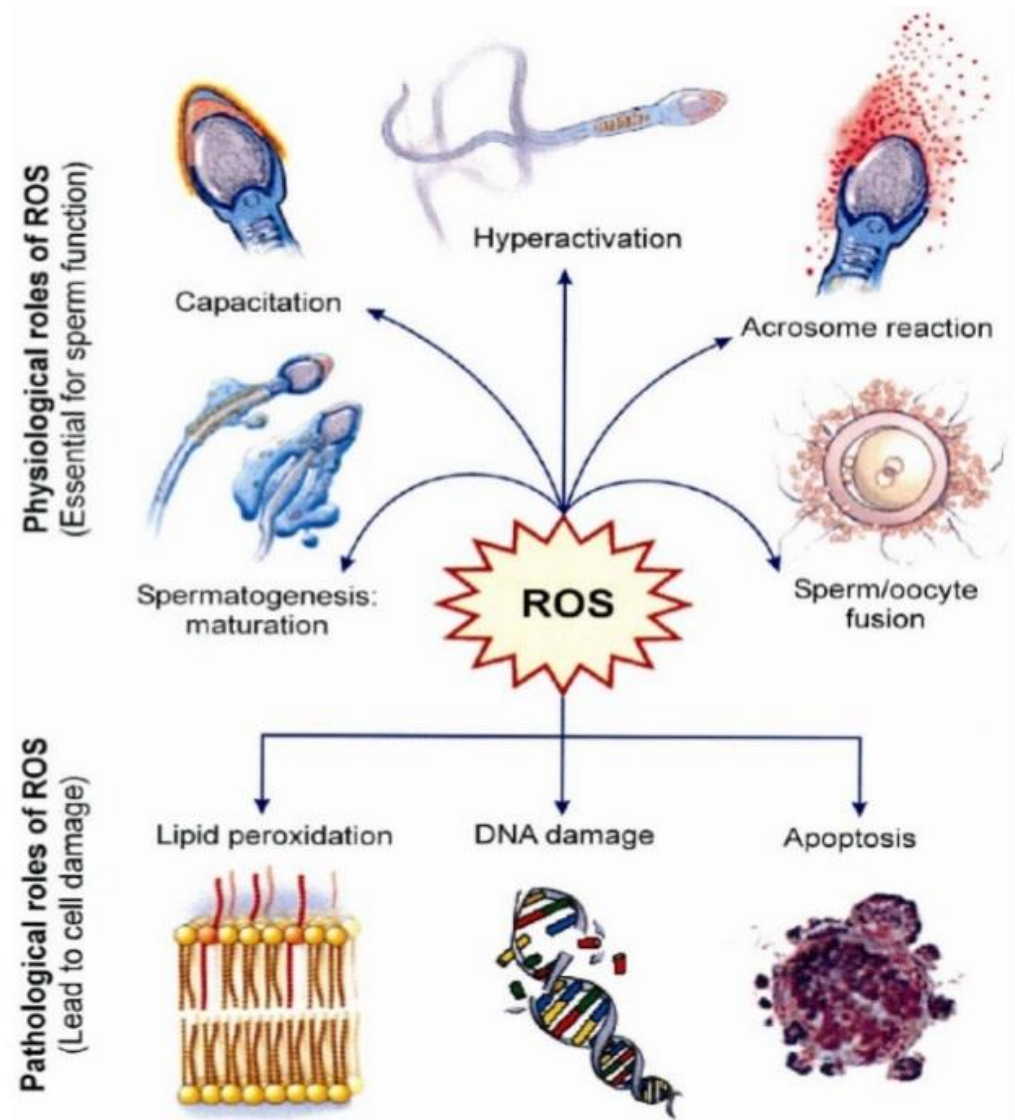
- Фруктоза
- ( более 13 мкМоль на эякулят )
- Цинк (более 2,4 мкМоль на эякулят)
- лимонная кислота (более 13 мкМоль на эякулят )
- Нейтральная  $\alpha$ -гликозидаза ( более 20 мЕд на эякулят )
- карнитин (более 0,5 моль/л)



# **ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЕ ТЕСТЫ**

# Окисдательный стресс

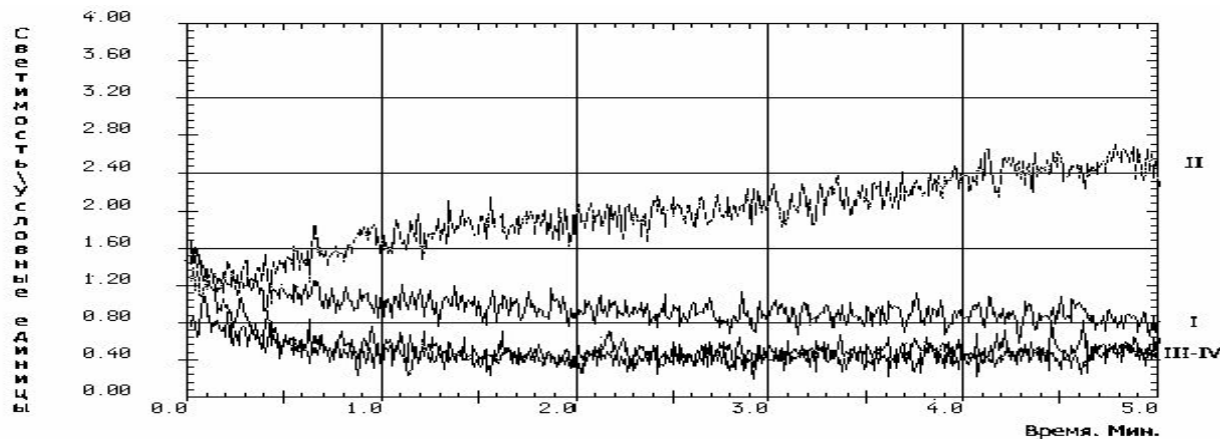
Нарушение сперматогенеза  
Снижение подвижности  
Нарушения гиперактивации  
и акросомной реакции  
Повреждение спермальных  
ДНК



# Методы выявления АФК

**Прямые:** люминолзависимая  
хемилюминесценция

**Косвенные:**  
Супероксиддисмутаза  
Глутатион-пероксидаза (ГТП)  
8-изопростан



# Акрсомная реакция

активация и высвобождение протеолитических ферментов (акрозин, гиалуронидаза и др.), играет ключевую роль в проникновении сперматозоида через блестящую оболочку яйцеклетки

**Спонтанная** - сперматозоиды теряют акросому до встречи с яйцеклеткой

**индуцированная** – выброс ферментов при встрече с яйцеклеткой

# Акрсомная реакция

**Своевременная акросомная реакция сперматозоидов – условие естественной фертилизации яйцеклетки.**

- Преждевременная - избыточность спонтанной реакции;
- отсутствие выброса акрозина при контакте с zona pellucida - недостаточность индуцированной реакции;
- сочетанный тип нарушений

# Методы изучения акросомной реакции

- Флюоресцентная микроскопия
- Проточная цитофлюорометрия
- Электронная микроскопия (выявление структурных дефектов акросомальной зоны)
- Определение общего акрозина (фотометрическое исследование активности акрозина в сперме)

# Фрагментация ДНК

- Бесплодие неясного генеза
- Остановки развития плода
- Неудачные попытки ЭКО
- Криоконсервация спермы
- Инфекции репродуктивного тракта
- Длительное применение лекарственных препаратов
- Повышенная температура тестикул
- Вредные факторы (в т.ч. курение)
- Возраст (старше 40 лет)
- Ожирение и метаболические нарушения

# Структура хромосом сперматозоидов и методы ее оценки

(A) **Метод TUNEL**, от terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling, - выявляет дефекты и разрывы в ДНК с помощью уридина на 3'ОН конце

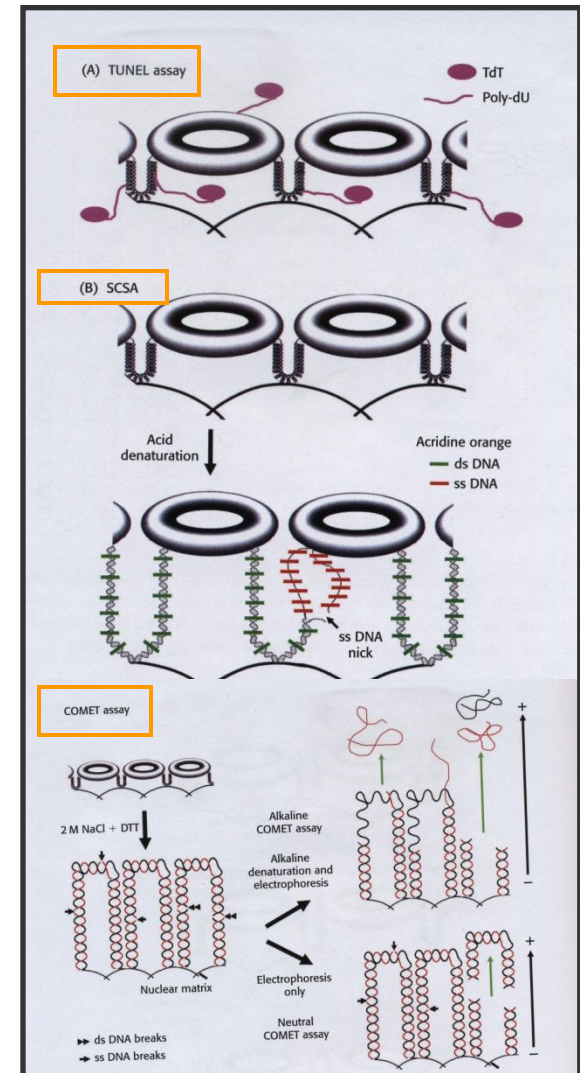
(Sgonc, Gruber, 1998)

(B) **Метод SCSA** (sperm chromatin structure assay) - выявляет ss и ds ДНК с помощью акридинового оранжевого и позволяет определить индекс фрагментации

(Don Evenson et al., 1987)

(C) **Метод COMET** – электрофорез фрагментов ДНК, полученных в нейтральных условиях (ds разрывы ДНК) и с помощью алкалина (ss разрывы ДНК)

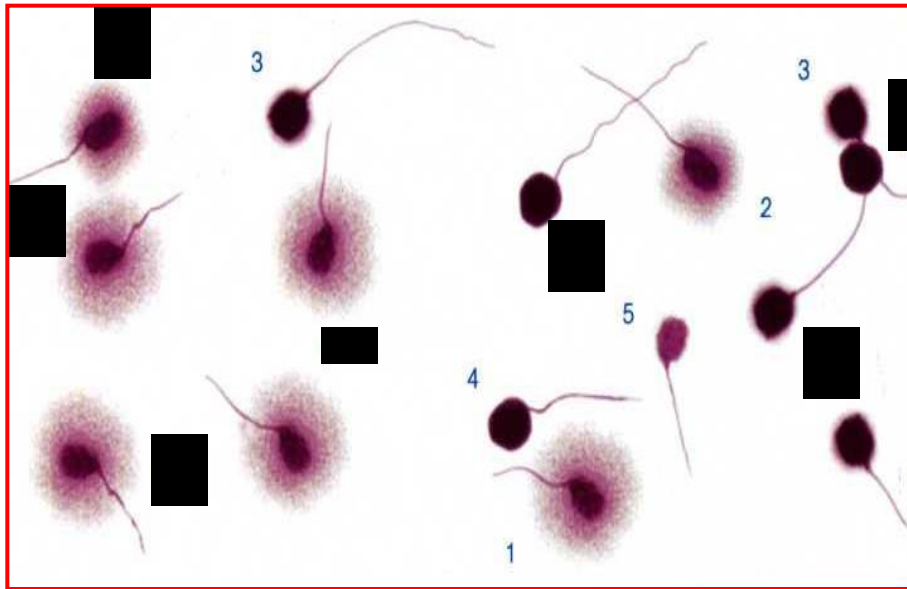
(Tomsu et al., 2002; McVicar et al., 2004)





# Дисперсия хроматина сперматозоидов (SCD) в агарозном геле

(Journal of Andrology, Vol. 24, No. 1,  
January/February 2003):

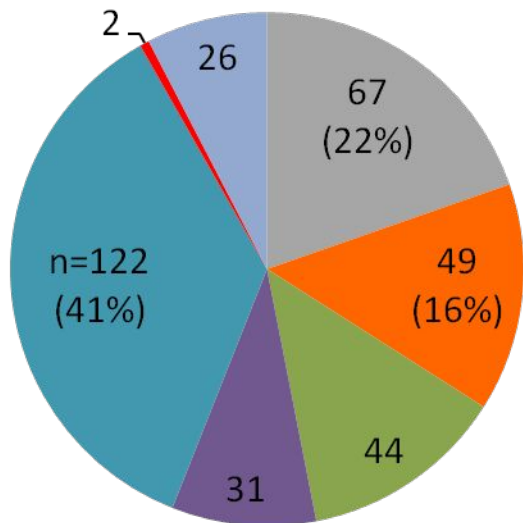


- Возможность оценить результаты при световой микроскопии
- Полуколичественная оценка результатов с вычислением индекса фрагментации

# **ДРУГИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

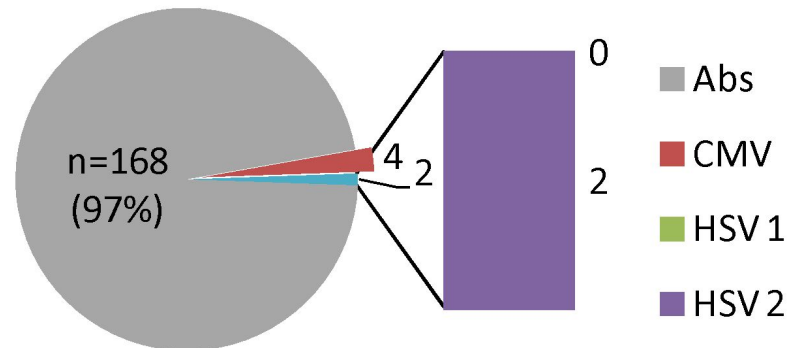
# Выявление инфекций

## Микроорганизмы (n=301)



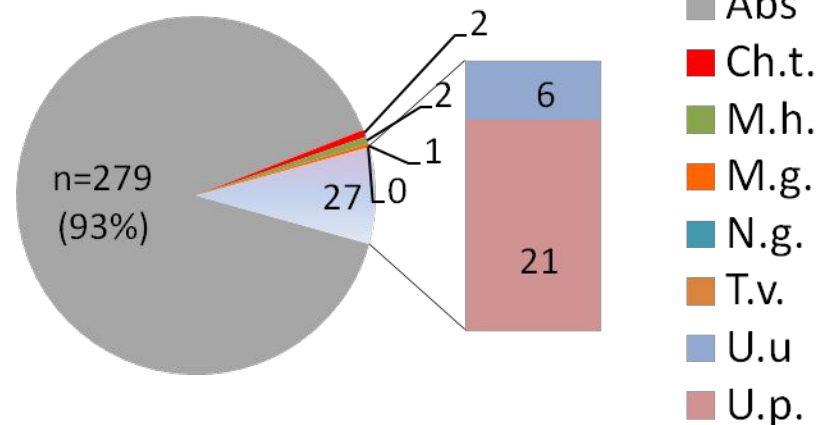
- Abs
- Enterobacteriaceae spp.
- Staphylococcus spp.
- Streptococcus spp.
- Анаэробы (Bacteroides, Prevotella и др.)
- Pseudomonas aeruginosa
- Candida spp.

## Герпес-вирусы (n=173)



- Abs
- CMV
- HSV 1
- HSV 2

## ИППП (n=301)



- Abs
- Ch.t.
- M.h.
- M.g.
- N.g.
- T.v.
- U.u
- U.p.

Все еще четко не определены характеристики эякулята присущие исключительно бесплодным пациентам и не характерные для фертильных, так как до **40%** бесплодных мужчин имеют нормальные показатели спермограммы.

*Moghissi et al., 1983; Guzick et al., 2001; van der Steeg et al., 2011; Belloc et al., 2014; Esteves, Chan, 2015 и др.*

Около **30%** пациентов с идиопатическим бесплодием имеют нарушения, которые, могут быть установлены исключительно с помощью функциональных тестов, включая измерение фрагментации ДНК, конденсации хроматина, оксидативного стресса и антиспермальных антител (АСАТ).

*Agarwal et al., 2008; 2016; Esteves et al., 2014, 2015; Pourmasumi et al., 2017; Rogenhofer et al., 2017 и другие*





