

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ»

Кафедра клинической лабораторной диагностики

Л.В. Батуревич, И.Д. Шилейко, Л.И. Алехнович

ИССЛЕДОВАНИЕ ОТДЕЛЯЕМОГО МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ

Минск, БелМАПО
2022

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ»

Кафедра клинической лабораторной диагностики

Л.В. Батуревич, И.Д. Шилейко, Л.И. Алехнович

ИССЛЕДОВАНИЕ ОТДЕЛЯЕМОГО МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ

Учебно-методическое пособие

Минск, БелМАПО
2022

УДК 616.64-008.846.2/.3-074/-078(075.9)

ББК 56.9я73

Б 28

Рекомендовано в качестве учебно-методического пособия
НМС Государственного учреждения образования
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»
от 30.12.2021 (протокол № 10)

Авторы:

Батуревич Л.В., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», кандидат медицинских наук, доцент

Шилейко И.Д., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», кандидат медицинских наук

Алехнович Л.И., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», кандидат медицинских наук, доцент

Рецензенты:

Субоч Е.И., заведующий онкологическим отделением (генетики) ГУ «РПНЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», к.м.н.

Кафедра инфекционных болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Батуревич Л.В.

Б 28 Исследование отделяемого мужских половых органов: учеб.- метод. пособие / Л.В. Батуревич, И.Д. Шилейко, Л.И. Алехнович. – Минск : БелМАПО, 2022. – 36 с.

ISBN 978-985-584-718-3

В учебно-методическом пособии представлены основные методы лабораторного исследования эякулята, позволяющие определять способность сперматозоидов к оплодотворению, а также диагностировать и оценивать нарушения фертильного статуса мужчины. Приведена краткая информация о мужской репродуктивной системе, изложены правила подготовки пациента к лабораторному исследованию и правила сбора биологического материала. Особое внимание уделено методу микроскопического исследования эякулята, описаны основные биохимические и иммунологические показатели спермы, подробно описана методика ДНК-фрагментации.

Учебно-методическое пособие предназначено для слушателей, осваивающих содержание образовательных программ переподготовки по специальности «Клиническая лабораторная диагностика» (дисциплины «Клиническая биохимия»); повышения квалификации слушателей из числа врачей клинической лабораторной диагностики, врачей-урологов, андрологов, репродуктологов и представителей других клинических специальностей, занимающихся вопросами фертильности.

УДК 616.64-008.846.2/.3-074/-078(075.9)

ББК 56.9я73

ISBN 978-985-584-718-3

© Батуревич Л.В., Шилейко И.Д.,
Алехнович Л.И., 2022

© Оформление БелМАПО, 2022

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИТЗ – индекс тератозооспермии

ИДС – индекс дефектности сперматозоидов

ОАТ – олигозоастенотератозооспермия

SDFI – (sperm DNA fragmentation index) индекса фрагментации ДНК сперматозоидов

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

MAR-тест – Mixed Antiglobulin Reaction

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Список сокращений.....	3
2. Оглавление.....	4
3. Введение.....	5
4. Характеристика мужской репродуктивной системы	6
5. Исследование эякулята	7
6. Макроскопическое исследование	8
7. Микроскопическое исследование	10
8. Биохимические показатели спермы	25
9. Иммунологические показатели	28
10. ДНК-фрагментация	30
11. Исследование секрета предстательной железы	33
12. Список рекомендуемой литературы	36

ВВЕДЕНИЕ

С каждым годом отмечается рост заболеваний органов репродуктивной системы у мужчин. Это связано с изменением образа жизни современного мужчины, влиянием вредных привычек и факторов окружающей среды, вступлением в брак в более позднем возрасте, бесконтрольным применением лекарственных средств. Влияние этих факторов на организм мужчины нередко приводит к развитию такой серьезной проблемы, как бесплодие.

Использование четкого алгоритма клинико-диагностических мероприятий при исследовании отделяемого мужских половых органов позволяет выявлять наличие патологии, ее причину и своевременно назначать лечение.

Лабораторное исследование отделяемого мужских половых органов должно включать как исследование эякулята, так и секрета предстательной железы.

Исследования эякулята проводится с целью:

1. Определения способности эякулята к оплодотворению.
2. Выявления заболеваний и/или патологических состояний, снижающих оплодотворяющую способность.

В рекомендациях ВОЗ приведены основные лабораторные показатели эякулята, используемые с диагностической целью. Однако, как показывает практика, перечень этих показателей не всегда достаточен для полноты оценки фертильного статуса мужчины. Именно поэтому перечень лабораторных показателей при исследовании эякулята должен определяться в первую очередь исходя из задач, поставленных врачом-клиницистом.

Комплексное и поэтапное обследование пациентов с мужским бесплодием позволяет дифференцированно оценивать причины и факторы, способствовавшие развитию инфертильности, назначать своевременное лечение и оценивать его эффективность в динамике.

ХАРАКТЕРИСТИКА МУЖСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

К мужским половым органам относят:

- яички – мужские гонады, которые вырабатывают половые гормоны и мужские половые клетки (гаметы или сперматозоиды);
- добавочные половые железы, к числу которых относятся семенные пузырьки, предстательная железа, бульбоуретральные железы и которые обеспечивают особые физико-химические свойства эякулята для поддержания высокой жизнеспособности сперматозоидов;
- семявыносящие пути – это придатки яичек, семявыносящие протоки, уретра, половой член, которые обеспечивают биологическое дозревание сперматозоидов и их выведение.

Паренхима яичек разделена тонкими соединительно-тканными перегородками на дольки, которые образованы извитыми семенными канальцами. Между канальцами находится соединительная ткань и группы клеток Лейдига – клеток, вырабатывающих гормон тестостерон. Тестостерон стимулирует развитие мужских половых органов, вторичных половых признаков, стимулирует сперматогенез, развитие костно-мышечной системы, образование фруктозы в семенных пузырьках, лимонной кислоты, кислой фосфатазы в предстательной железе.

Сперматогенез происходит в семенных канальцах. Они выстланы клетками сперматогенеза и поддерживающими клетками Сертоли, которые осуществляют трофическую функцию, обеспечивая питание незрелых мужских гамет. Между поддерживающими клетками располагаются сперматогонии – клетки-родоначальники сперматогенеза. В результате ряда делений и преобразований они превращаются в сперматоциты I и II типа. Сперматоциты дают начало зрелым клеткам — сперматидам. Сперматиды превращаются в сперматозоиды, при этом хроматин ядра уплотняется, ядро меняет форму и превращается в головку сперматозоида, которая стремится выйти за пределы клетки, вытягиваясь из нее. Цитоплазма сохраняется только вокруг шейки сперматозоида.

Сформировавшиеся сперматозоиды из яичка направляются в его придаток, который расположен на внутренней поверхности яичка в виде парного органа. Функция придатков заключается в концентрации сперматозоидов. Здесь происходит дальнейшее биологическое дозревание семенных клеток. Прошедшие через придаток сперматозоиды проявляют большую активность и значительную жизнеспособность. Придаток яичка переходит в семявыносящий проток, который, выйдя из мошонки, проходит через паховый канал в малый таз к предстательной железе.

Семенные пузырьки расположены у основания мочевого пузыря сверху предстательной железы. Выводные протоки семенных пузырьков открываются вместе с протоками предстательной железы на семенном бугорке, расположенном в простатическом отделе мочеиспускательного канала. Семенные пузырьки вырабатывают под влиянием андрогенов секрет, играющий роль защитного коллоида. Вязкость и студенистость секрета предохраняет сперматозоиды от повреждений. Эпителий семенных пузырьков вырабатывает фруктозу, которая является источником энергии спермы.

Большую часть спермы составляет секрет предстательной железы. В нем содержатся электролиты, ферменты, холестерин, лимонная кислота, спермин, иммуноглобулины, обеспечивающие бактерицидные свойства. Биологическая роль секрета простаты состоит в разжижении спермы, что способствует усилению подвижности сперматозоидов.

Каждую секунду в мужском организме вырабатывается более тысячи сперматозоидов. С момента наступления полового созревания и до самой смерти этот процесс продолжается непрерывно. На состояние репродуктивной системы мужчины, как и его здоровье в целом, влияют разнообразные факторы, способные вызывать сбои в работе органов репродуктивной системы: генетические, эндокринные, инфекционные и др.

При подозрении на патологию репродуктивной системы мужчины исследуют отделяемое мужских половых органов: эякулят и сок предстательной железы.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЯКУЛЯТА

Исследование эякулята является важным и, зачастую, стартовым лабораторным методом, позволяющим оценить фертильность мужчины.

Лабораторное исследование эякулята включает следующие этапы:

1. Преаналитический (отбор спермы).
2. Аналитический:
 - спермограмма,
 - биохимическое исследование эякулята,
 - иммунологическое исследование эякулята (MAR-тест и др.),
 - специальные методы исследования (ДНК-фрагментация и др.).
3. Постаналитический (интерпретация результата).

На первом (преаналитическом) этапе важно четкое соблюдение правил подготовки пациента к исследованию, получения биологического материала и его доставки в лабораторию.

Подготовка пациента и правила сбора эякулята для исследования

Для первичной оценки эякулята необходимо 2 исследования с интервалом не менее 7 дней, но не более 3-х недель. Если полученные результаты заметно различаются, необходимо исследовать третий образец.

Эякулят для исследования получают после 2 – 7-дневного полового воздержания. В этот период необходимо исключить употребление алкоголя, проведение массажа предстательной железы и семенных пузырьков, посещение саун и бань.

Сбор спермы проводят методом мастурбации в специально оборудованном помещении лаборатории. Материал собирают в чистую сухую стеклянную или тефлоновую посуду, желателно градуированную. Особенно тщательно должны быть собраны первые капли спермы, так как в них содержится около 70% сперматозоидов. Недопустимо собирать и доставлять эякулят в презервативе или получать прерыванием полового акта. В отдельных случаях можно получать эякулят в домашних условиях, но исключительно в посуду, полученную в лаборатории. В этом случае на бланке обязательно отмечается место сбора материала.

При транспортировке спермы в лабораторию особое внимание следует уделять температурному режиму, поскольку сперматозоиды обладают небольшим запасом энергии, которая при несоблюдении температурного режима быстро истощается. При низкой температуре необходимо оградить сперму от переохлаждения. Доставка спермы в лабораторию должна осуществляться не позднее 30 – 40 мин после эякуляции.

Исследование спермы (спермограмма) включает изучение физико-химических свойств семенной жидкости и микроскопическое исследование эякулята.

МАКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Физические свойства семенной жидкости.

Объем. Количество спермы измеряют в градуированной пробирке по уровню нижнего мениска биологической жидкости. У здоровых мужчин объем спермы за эякуляцию составляет 1,5 – 6 мл. При увеличении объема (полиспермии) эякулят обладает достаточной оплодотворяющей способностью только в случае нормальной концентрации в нем сперматозоидов. Увеличение объема спермы происходит в основном за счет гиперпродукции секретов предстательной железы и семенных пузырьков, функция которых регулируется тестостероном. При андрогенной недостаточности объем эякулята уменьшается, развивается олигоспермия. При олигоспермии не происходит нейтрализация кислой реакции

влагалищного секрета, что влияет на скорость движения и сохранность сперматозоидов и снижает фертильность мужчины. Объем эякулята является косвенным показателем патоспермии. Так, например, уменьшение объема эякулята может свидетельствовать о гормональном (андрогенная недостаточность) или обтурационном происхождении патоспермии.

Цвет. Семенная жидкость в норме имеет серовато-беловатый цвет. Изменять цвет эякулята могут различные патологические примеси. При гемоспермии эякулят окрашен в розоватый или коричневатый цвет за счет присутствия в сперме эритроцитов. Желтый цвет семенной жидкости наблюдается при пиоспермии, обусловленной повышенным содержанием лейкоцитов. Желтовато-беловатый цвет эякулята может наблюдаться при длительном половом воздержании и обусловлен наличием органического соединения – флавина.

Прозрачность. В норме эякулят мутный. Мутность спермы зависит от количества сперматозоидов: чем прозрачнее сперма, тем меньшее количество сперматозоидов в ней содержится.

Запах. Эякулят в норме обладает специфическим запахом, который обусловлен наличием в нем спермина предстательной железы.

Консистенция. В норме во время выделения эякулят имеет жидкую консистенцию, но сразу после выделения на воздухе в результате действия фермента везикулазы приобретает студенистую консистенцию. Через 20 – 30 мин при комнатной температуре происходит разжижение эякулята за счет ферментов секрета простаты (фибринолизина и фибриногеназы). Перед полным разжижением спермы происходит сагоподобное свертывание: в частично разжиженном эякуляте выявляются тельца, напоминающие зерна саго.

В случае наличия хронического воспалительного процесса в предстательной железе и семенных пузырьках эякулят остается вязким, не разжижается, что препятствует передвижению сперматозоидов и отрицательно влияет на оплодотворяющую способность спермы.

Вязкость эякулята определяется после полного его разжижения. Для ее определения используют стеклянную палочку с оплавленным концом, которой перемешивают сперму, избегая пенообразования. После перемешивания палочку медленно извлекают и отмечают на глаз длину нити до разрыва. В норме эта величина составляет от 1 – 5 мм (на поверхности палочки остается капля спермы) до 2 см. При пониженной вязкости образуется нить короче 1 мм (капли на палочке не остается).

Вязкость также можно определять с помощью гемовискозиметра (норма колеблется в пределах 6,0 – 6,6). Вязкость разжиженной спермы в 6,5

раз больше вязкости воды и в три раза больше вязкости сыворотки крови.

Повышенная вязкость спермы обычно связана с наличием большого количества слизи, которая появляется при воспалительных процессах добавочных половых желез. Уменьшение вязкости характерно для поражения семенных пузырьков.

рН-реакция. Реакция свежей семенной жидкости определяется при помощи универсальной индикаторной бумаги или с помощью рН-метра. В норме рН спермы колеблется от 7,2 до 8,0. Постоянная концентрация водородных ионов обеспечивает нормальную подвижность сперматозоидов. При наличии большого количества сперматозоидов в результате интенсивного фруктолиза, сопровождающегося накоплением молочной кислоты, рН снижается. При воспалении семенных пузырьков, а также при закупорке их выводных протоков рН эякулята сдвигается в кислую сторону, что приводит к резкому снижению оплодотворяющей способности семенной жидкости. При сдвиге рН в кислую сторону до 6,0 и ниже наблюдается некроспермия. Резко щелочная реакция спермы (рН 8,0 – 9,0) свидетельствует о патологии предстательной железы.

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Микроскопическое исследование спермы проводится после ее разжижения, но не позже одного часа после эякуляции. Если сперма при комнатной температуре не разжижается, ее необходимо поместить на несколько минут в термостат при температуре 37°C. В том случае, когда в нативном препарате сперматозоиды не обнаруживаются, то эякулят центрифугируют при 3000 об/мин 10 минут и из полученного осадка готовят мазки.

Микроскопическое исследование эякулята подразделяется на 2 этапа:

- исследование нативных препаратов;
- исследование окрашенных препаратов.

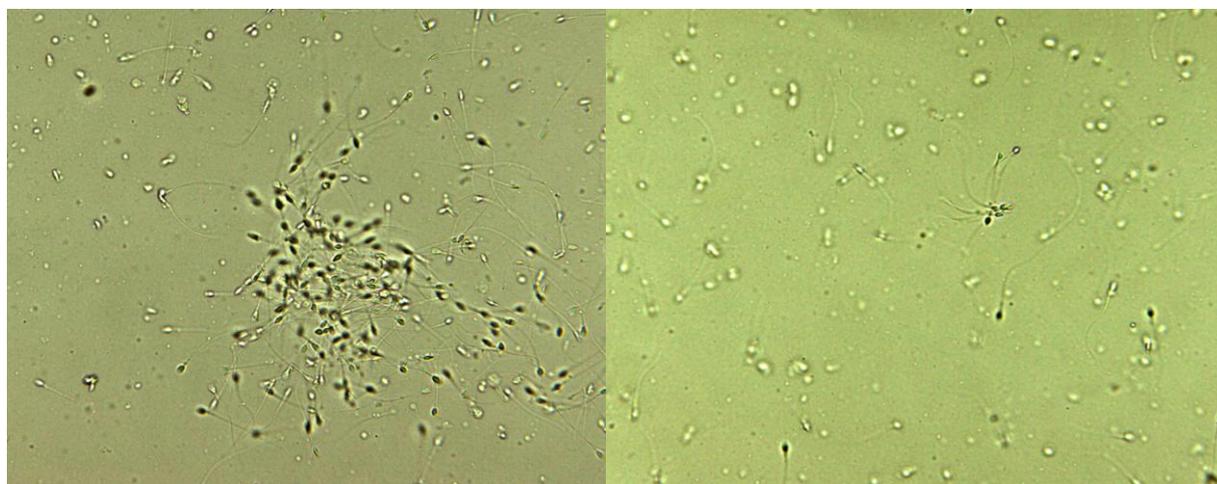
При микроскопии нативных препаратов устанавливают наличие или отсутствие сперматозоидов, характер подвижности, наличие агглютинации и агрегации, присутствие и среднее количество в поле зрения круглых клеток, кристаллов, подсчитывают подвижность (кинезисграмму) и количество сперматозоидов. В нативном препарате можно грубо оценить морфологию мужских половых клеток.

Одним из показателей патологии эякулята является *агглютинация* – склеивание подвижных сперматозоидов, которая оценивается при изучении нативного препарата (рис. 1). В норме в эякуляте агглютинация не выявляется.

В случае наличия агглютинации ее степень оценивается полуколичественно в плюсах или в степенях:

- склеивание менее 10 сперматозоидов на агглютинат оценивается как + или 1 степень;
- склеивание 10 – 50 сперматозоидов на агглютинат оценивается как ++ или 2 степень;
- склеивание более 50 сперматозоидов оценивается как +++ или 3 степень;
- склеивание всех сперматозоиды оценивается как ++++ или 4 степень.

Агглютинация может наблюдаться как при образовании специфических антител (агглютининов) при аутоиммунизации антигенами тестикулярного происхождения, так и при различных воспалительных заболеваниях половых органов, сопровождающихся накоплением молочной кислоты.



А

В

Рис.1 – Агглютинация

А – агглютинация +++; В – агглютинация +

Агрегация (псевдоагглютинация) – хаотическое скопление неподвижных сперматозоидов на тяжках слизи или клеточных элементах. Наличие и степень выраженности агрегации оценивается по аналогии с агглютинацией: в нативном препарате, в плюсах или баллах.

Клеточные элементы. В эякуляте могут присутствовать единичные клеточные элементы: эритроциты, лейкоциты, эпителиоциты, клетки сперматогенеза. Количественная оценка их содержания в биоматериале осуществляется путем подсчета среднего количества в одном поле зрения. Если имеется необходимость, то все перечисленные клеточные элементы можно подсчитать в камере Горяева, по аналогии с подсчетом сперматозоидов. Количественная оценка клеточных элементов эякулята имеет важное значение, поскольку позволяет врачу-клиницисту следить за эффективностью лечения воспалительных заболеваний половых органов.

Эритроциты (рис.2). В норме в эякуляте эритроциты отсутствуют, но может отмечаться присутствие единичных эритроцитов в препарате. Увеличение количества эритроцитов свидетельствует о воспалительных процессах, травмах, злокачественных опухолях или застойных явлениях в органах репродуктивной системы.

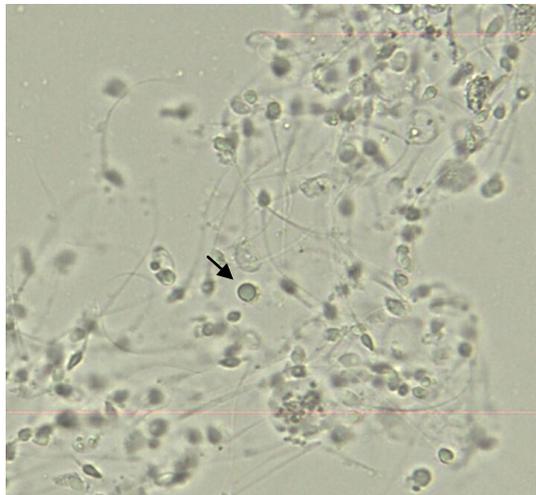


Рис.2 – Эритроцит
Эритроцит обозначен →

Лейкоциты (рис.3). В норме в эякуляте обнаруживаются единичные (до 5) лейкоциты в поле зрения. Их количество увеличивается при воспалительных процессах различной этиологии. Дифференцируют лейкоциты в мазках, окрашенных по Романовскому. Точный количественный подсчет лейкоцитов осуществляется с использованием счетной камеры. Пороговой величиной количества лейкоцитов в эякуляте у здоровых мужчин является значение менее $1,0 \times 10^6$ /мл.

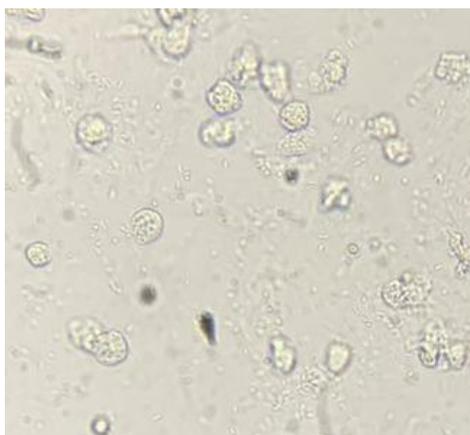


Рис.3 – Лейкоциты

Макрофаги, сперматофаги (рис.4). Макрофаги обнаруживаются при хроническом воспалительном процессе в органах репродукции. В случае, когда по периферии макрофагов видны выступающие хвосты сперматозоидов, можно говорить о наличии сперматофагов – макрофагов с

фагоцитированными сперматозоидами. Сперматофаги представляют собой круглые большие (диаметром 20 – 35 мкм) клетки со светлой, часто вакуолизированной цитоплазмой; обнаруживаются при застое спермы различного происхождения и при аутоиммунном бесплодии.

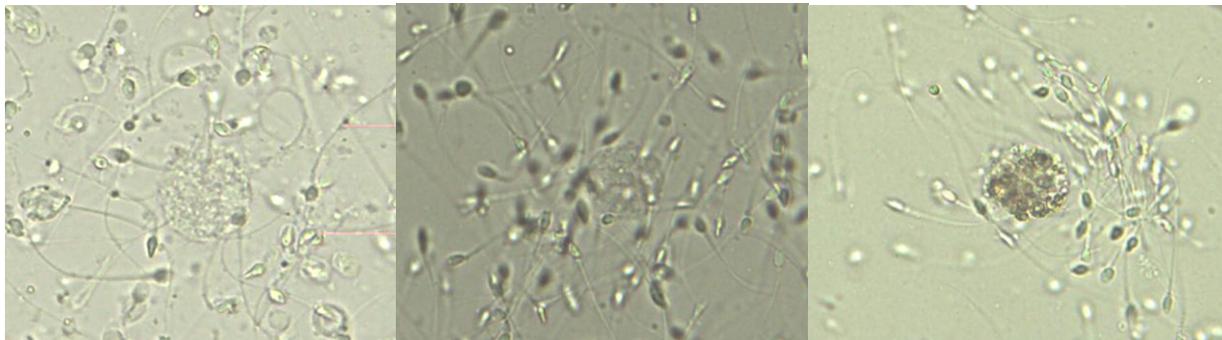


Рис.4 – Макрофаги

В норме в эякуляте в незначительном количестве могут быть обнаружены *эпителиальные клетки* (рис.5):

1. Клетки многослойного плоского ороговевающего эпителия, источником которых является эпителий головки полового члена и крайней плоти. Представляют собой крупные, полигональные или округлые клетки с маленьким круглым ядром. В нативном препарате их цитоплазма восковидная, сильно преломляет свет.

2. Клетки многослойного плоского неороговевающего эпителия. Многослойный плоский неороговевающий эпителий выстилает дистальную треть мочеиспускательного канала. Клетки этого эпителия имеют вид крупных полигональных образований с мелким центрально расположенным ядром. В нативном препарате цитоплазма клеток прозрачная, в ней имеются не ярко выраженные признаки дегенерации: вакуолизация и зернистость.

3. Клетки цилиндрического эпителия. Цилиндрический эпителий выстилает губчатую, перепончатую и дистальную простатическую часть уретры. Его клетки имеют вытянутую форму с расширенным апикальным и заостренным дистальным концами. Ядро и цитоплазма этих клеток находится в состоянии выраженной дегенерации.

4. Клетки переходного эпителия. Переходный эпителий выстилает слизистые оболочки проксимального отдела мочеиспускательного канала, семявыносящих протоков и придатков яичек. Они имеют вид округлых клеток с крупным одним или 2-3 ядрами и цитоплазмой с умеренно выраженными признаками дегенерации.



Рис.5 – Эпителиоциты

А – клетка переходного эпителия; В, С – клетки многослойного плоского эпителия

При воспалительных процессах в соответствующих отделах семявыносящих путей эпителиальные клетки в эякуляте могут быть обнаружены в значительном количестве. Они хорошо дифференцируются в нативном и окрашенном препаратах. При оформлении результатов лабораторного исследования обычно указывают их присутствие и ориентировочное количество (в большом количестве, единичные и т.д.).

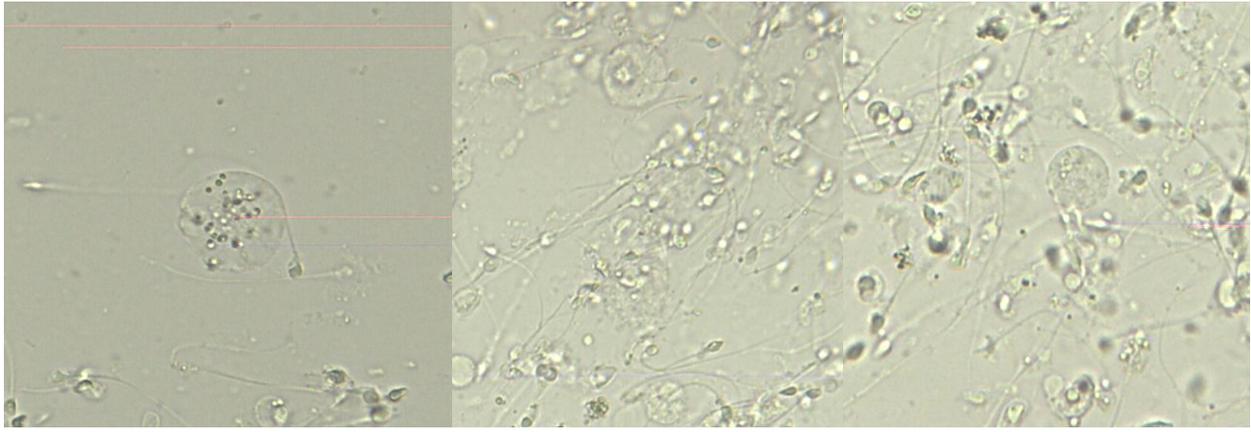
Клетки сперматогенеза (сперматогонии, сперматоциты и сперматиды) (рис.б). Клетки сперматогенеза в нативном препарате имеют вид правильных округлых клеток разной величины с гомогенной, чаще прозрачной, цитоплазмой одним или несколькими ядрами. На периферии цитоплазмы просматривается редкая зернистость.

Дифференцируются клетки сперматогенеза только в окрашенном мазке:

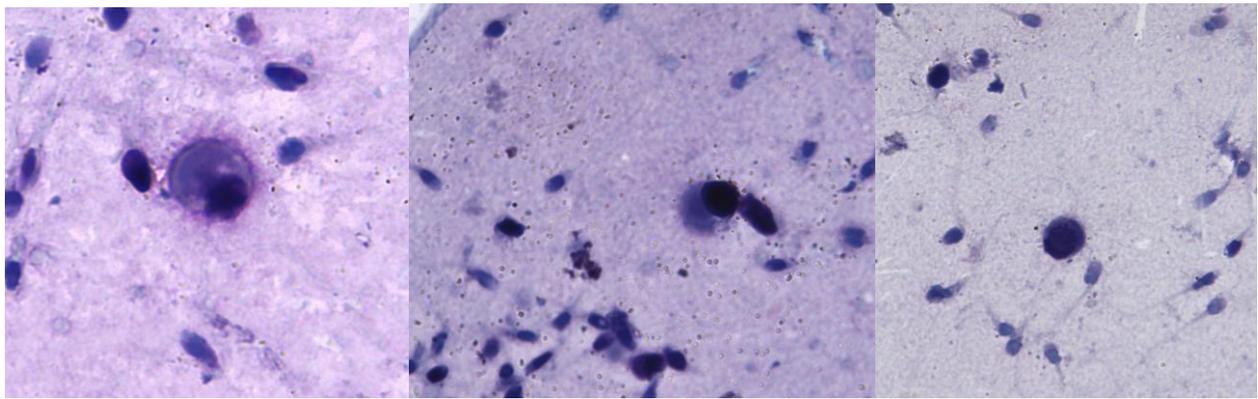
– Сперматогонии – мелкие клетки диаметром 5 – 12 мкм с круглым центрально расположенным мелкозернистым ядром, занимающим большую часть клетки и узким ободком базофильной цитоплазмы.

– Сперматоциты – крупные округлые клетки диаметром 15 – 19 мкм с крупным круглым ядром, хроматин которого имеет петлистую структуру. Могут быть видны единичные ядрышки. Цитоплазма широкая базофильная или базофильно-сероватого цвета, может присутствовать мелкая зернистость. Встречаются многоядерные сперматоциты.

– Сперматиды – небольшие округлые, овальные или вытянутой формы клетки с плотным гиперхромным ядром, расположенным центрально или, чаще, эксцентрично. Цитоплазма широкая слабобазофильная или сероватая (полихроматофильная), вакуолизированная.



А



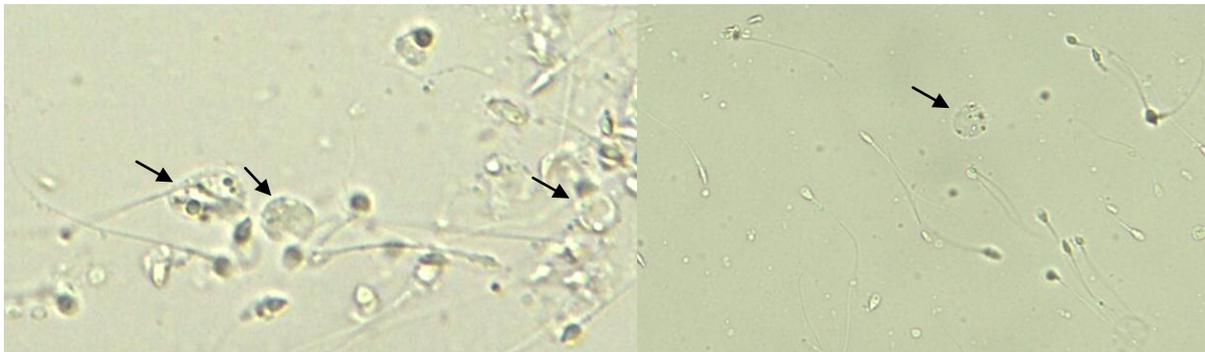
В

Рис.6 – Клетки сперматогенеза

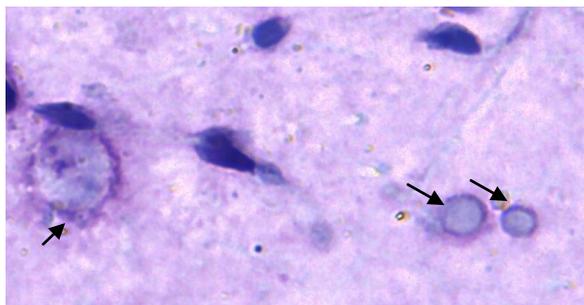
А – нативный препарат; В – в окрашенном препарате

– Остаточные тельца (рис.7) – представляют собой фрагменты цитоплазмы сперматид. В окрашенном препарате остаточные тельца имеют слабо базофильный или серый цвет.

В нормальном эякуляте обнаруживаются сперматиды и остаточные тельца и редко – сперматоциты.



А



В

Рис.7 – Остаточные тельца (обозначены →)

А – остаточные тельца в нативных препаратах; В – остаточные тельца в окрашенном препарате

Кристаллические образования обнаруживаются и хорошо идентифицируются в нативном препарате.

В эякуляте встречаются следующие виды кристаллических образований:

– Липоидные тельца («лецитиновые зерна») (рис.8) — мелкие матовые кристаллы округлой или слегка вытянутой формы, образующиеся из сока предстательной железы, лецитина не содержат. В норме липоидные тельца в эякуляте содержатся в большом количестве и отражают функциональную активность простаты, зависящую от уровня тестостерона в организме мужчины. При патологии простаты их количество уменьшается, вплоть до полного исчезновения.

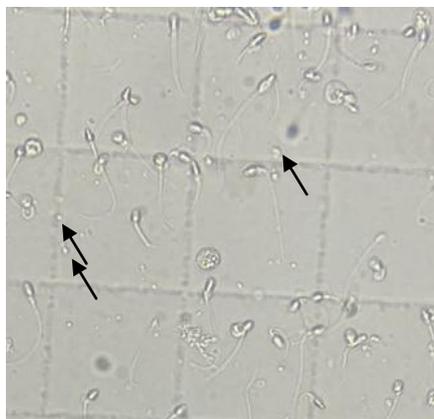


Рис.8 – Липоидные тельца (обозначены →)

– Амилоидные тельца (конкременты, гиалиновые шары) (рис.9) – крупные овальные или округлые кристаллы с характерным слоистым строением, напоминающим «спил дерева», с мелкозернистой желтого цвета центральной частью. Обнаруживаются при застойных явлениях секрета в предстательной железе.

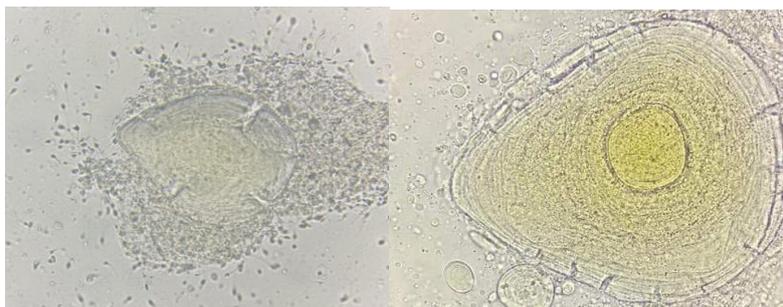


Рис.9 – Амилоидные тельца (нативные препараты)

– Кристаллы Беттхера (спермина) (рис.10) – бесцветные удлиненной призматической, ромбовидной или друзообразной формы разных размеров кристаллы, представляющие собой фосфорнокислую соль спермина и образующиеся из секрета предстательной железы. Кристаллы спермина могут образовываться в случае недостаточного сперматогенеза (гипоспермии), при простатите или при несоблюдении температурного режима (при охлаждении эякулята) на преаналитическом этапе.



Рис.10 – Кристаллы спермина (обозначены →)

Слизь в нормальном эякуляте отсутствует. Ее присутствие указывает на воспалительные процессы в половых органах. Слизь замедляет подвижность сперматозоидов. Наличие слизи может исказить точный подсчет количества сперматозоидов и оценку их подвижности.

Подвижность сперматозоидов (кинезисграмма).

Кинезисграмма – это процентное соотношение сперматозоидов с различной подвижностью.

Количество подвижных сперматозоидов является главным критерием при оценке их полноценности. Активно подвижные сперматозоиды обладают быстрым поступательным целенаправленным вращательным движением с перемещением в поле зрения. Малоподвижные сперматозоиды двигаются медленно, совершая колебательное, манежное движение или подергивание на месте.

Исследование проводят при температуре 20 – 25°C с использованием «окошечка Фонио» или окулярной сетки с решеткой для ограничения поля зрения. При необходимости сперма разводится теплым изотоническим

раствором хлорида натрия в 10 – 20 раз. На сухое предметное стекло наносят каплю нативного или разведенного эякулята, которую накрывают покровным стеклом, избегая попадания пузырьков воздуха. Подсчитывают не менее 200 клеток не менее чем в 5 полях зрения, отмечая количество активно подвижных, малоподвижных и неподвижных. После чего рассчитывают процентное соотношение сперматозоидов с различной подвижностью.

При общей визуальной оценке сперматозоиды разделяют на группы:

- прогрессивно-подвижные (PR, progressive motility) – сперматозоиды двигаются активно прямолинейно или по кругу большого радиуса;
- непрогрессивно-подвижные (NP, non- progressive motility) – сперматозоиды двигаются по кругу малого радиуса или имеется только биение жгутика;
- неподвижные (IM, immotility) – полное отсутствие движения сперматозоидов.

Для оценки подвижности определяют общую подвижность (PR + NP) и прогрессивную подвижность (PR) – в процентах от общего количества подсчитанных сперматозоидов. Референтные значения: для PR = 32%, для PR + NP = 40%.

Оплодотворяющая способность спермы зависит от продолжительности движения сперматозоидов, которая определяется при помощи динамической кинезисграммы. Для этого определяют процент подвижных сперматозоидов через 3 – 6 – 12 – 24 часа. В норме через каждые 2 – 3 часа подвижность сперматозоидов уменьшается на 20%. Длительность движения напрямую зависит от степени патоспермии: при более глубоких структурных нарушениях сперматозоидов длительность их движения существенно снижается.

Количественное определение сперматозоидов.

Перед подсчетом количества сперматозоидов производят их обездвиживание.

Для обездвиживания можно использовать любой из следующих реактивов:

1. Раствор Барбагалло: 7,0 мл 40% нейтрального формалина и 93 мл 0,85% раствора NaCl.
2. Жидкость А.А. Рубенкова: 0,1 г основного фуксина, 0,02 мл краски Романовского, 0,2 мл концентрированной карболовой кислоты, 0,1 мл глицерина, 2 мл 96° этанола, 100 мл 0,85% раствора NaCl. Жидкость Рубенкова окрашивает сперматозоиды, что позволяет наряду с подсчетом общего количества изучить их морфологию.
3. 1% водный раствор метиленового синего.

4. 10% раствора карболового фуксина.

Эякулят разводится раствором для обездвиживания в соотношении 1:9 (1 часть эякулята и 9 частей раствора). В зависимости от количества сперматозоидов, оцененного методом обзорной микроскопии нативного препарата, соотношение эякулята и раствора для обездвиживания можно уменьшать или увеличивать.

Подсчет обездвиженных сперматозоидов осуществляется в 5 больших квадратах счетной камеры Горяева, расположенных по диагонали сетки, с учетом их разведения раствором для обездвиживания. Если сперматозоид расположен на границе квадрата сетки счетной камеры, то он учитывается по расположению его головки (если головка сперматозоида находится внутри квадрата – сперматозоид учитывается при подсчете, если вне квадрата – не учитывается).

Формула подсчета количества сперматозоидов в камере Горяева:

$$X = \frac{A \times 250 \times 10 \times 1000}{5} = A \times 500000,$$

где X – количество сперматозоидов в 1 мл эякулята,

A – количество сперматозоидов в посчитанных больших квадратах камеры Горяева,

250 (1/250) – объем одного большого квадрата,

10 – степень разведения спермы,

1000 – коэффициент перевода в мл,

5 – количество больших квадратов, в которых подсчитаны сперматозоиды.

Если количество сперматозоидов незначительное (единичные сперматозоиды в поле зрения в нативном препарате), то для подсчета их количества к 1 мл эякулята добавляют 2 капли раствора для обездвиживания и подсчитывают в 100 больших квадратах камеры Горяева. Расчет количества сперматозоидов в этом случае осуществляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 250 \times 1000}{100} = A \times 2500,$$

где X – количество сперматозоидов в 1 мл эякулята,

A – количество сперматозоидов в 100 больших квадратах камеры Горяева,

250 (1/250) – объем одного большого квадрата,

1000 – коэффициент перевода в мл,

100 – количество больших квадратов, в которых подсчитаны сперматозоиды.

Согласно рекомендациям ВОЗ, подсчет количества сперматозоидов проводят в 2-х счетных камерах и вычисляют среднее значение.

Если сперматозоиды в нативном препарате не обнаруживаются или их количество настолько мало, что его невозможно определить вышеописанными методами, рекомендуется возобновить поиск мужских гамет в полученном осадке после центрифугирования. Определенный объем эякулята центрифугируется в течение 15 мин со скоростью 1500 об/мин, после чего надосадочная спермоплазма удаляется.

Общее количество сперматозоидов в эякуляте определяют путем умножения концентрации (количество сперматозоидов в 1 мл) сперматозоидов на объём эякулята.

В норме в 1 мл спермы содержится не менее 15×10^6 сперматозоидов, во всем эякуляте количество сперматозоидов должно превышать 39×10^6 .

Исследование окрашенных препаратов эякулята проводят с целью оценки количества жизнеспособных сперматозоидов и особенностей их морфологии.

Определение жизнеспособности сперматозоидов

Для определения жизнеспособности сперматозоидов используется методика окрашивания по Блуму в двух модификациях:

1. эозином (5% водный раствор эозина без нигрозина);
2. эозин-нигрозином (3 – 5% водный раствор эозина с 10% водным раствором нигрозина).

При окраске эякулята должна соблюдаться следующая пропорция: 1:2:3 (1 часть свежего эякулята, 2 части раствора эозина и 3 части раствора нигрозина).

В окрашенном препарате подсчитывают не менее 200 клеток, выделяя отдельно живые (жизнеспособные) и мертвые (нежизнеспособные) сперматозоиды. Жизнеспособность сперматозоидов оценивается по окрашиванию их головок: у мертвых сперматозоидов головка окрашивается в красно-фиолетовый цвет, у живых – головка не окрашивается. При использовании раствора эозина фон препарата окрашивается в розовый цвет, добавление раствора нигрозина обеспечивает темно-синий фон, на котором сперматозоиды выглядят более контрастно, что упрощает идентификацию бледно окрашенных клеток (рис.11).

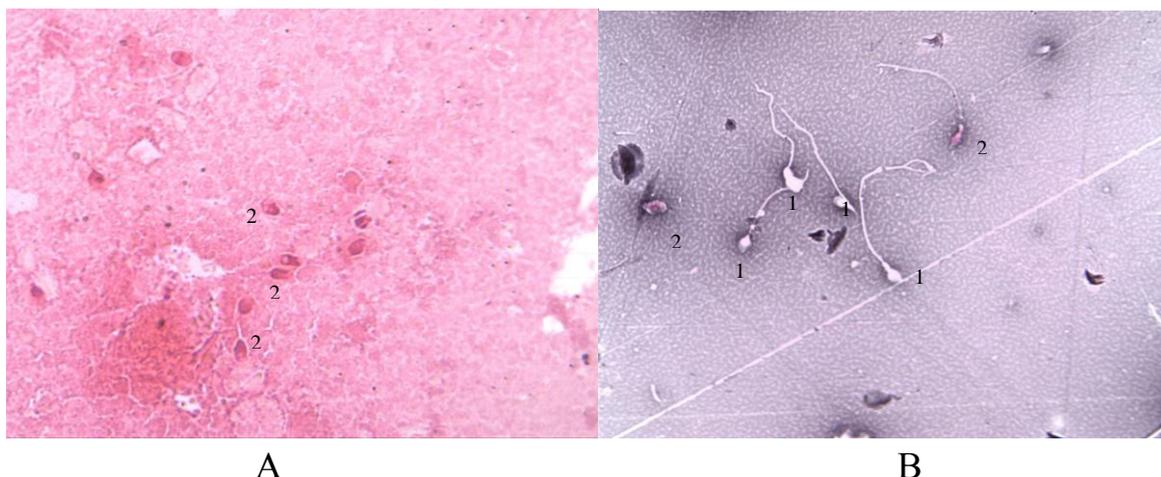


Рис.10 – Мазок эякулята, окрашенный по Блуму (1 – жизнеспособные сперматозоиды, 2 – нежизнеспособные сперматозоиды)

А – окраска эозином, В – окраска эозин-нигрозин

В нормальном эякуляте количество жизнеспособных сперматозоидов составляет не менее 58%.

Обычно количество нежизнеспособных сперматозоидов соответствует количеству неподвижных сперматозоидов, что является косвенным контролем точности подсчета подвижности сперматозоидов. В случае существенного превышения количества нежизнеспособных сперматозоидов над количеством неподвижных сперматозоидов можно предполагать наличие структурных дефектов в строении хвостика гамет – синдром Картагенера.

Морфология сперматозоидов

Оценку морфологических особенностей сперматозоидов в эякуляте можно проводить при микроскопии нативного препарата, однако при этом сложно оценивать многие детальные морфологические изменения в структуре сперматозоидов. Поэтому для оценки всех морфологических особенностей сперматозоидов мазки окрашивают по Романовскому, Паппенгейму, Шорру, Diff-Quik или другими специальными красителями.

Сперматозоид (рис.12) – мужская половая клетка, представляет собой длинную (55 – 65 мкм) клетку со жгутом. Сперматозоид состоит из головки, шейки и хвоста. Форма головки овальная, сплюснутая в переднезаднем направлении, заостренная на переднем конце. Большую часть головки занимает ядро. Хроматин ядра состоит из 23 хромосом, что составляет 50% генетической информации, наследуемой ребенком. Впереди ядра располагается акросома, содержащая ферменты, необходимые для проникновения сперматозоида в яйцеклетку. Шейка короткая, переходит в тело и затем в хвост, содержащий фибриллы, обеспечивающие движение хвоста и подвижность сперматозоида.

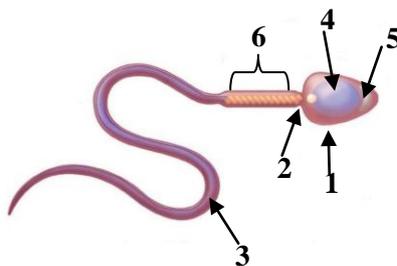


Рис.12 –Сперматозоид

1 – головка, 2 – шейка, 3 – хвост, 4 – ядро, 5 – акросома, 6 – тело

Для оценки морфологии в окрашенном препарате подсчитывают не менее 200 сперматозоидов и оценивают соотношение морфологически нормальных и патологических форм сперматозоидов (в целом и по отдельным видам изменений), а также количество клеток сперматогенеза. По рекомендациям ВОЗ при оценке морфологии сперматозоидов следует придерживаться «строгим» критериям Kruger (или Тайгербергской классификации).

Критерии Kruger-а соответствуют признакам «идеального» сперматозоида (четкие границы размеров и морфометрии):

- форма головки сперматозоида округло-овальная;
- длина головки 4,5 – 5,0 мкм, ширина 1,5 – 1,75 мкм;
- акросома занимает 40 – 70% площади головки (допустимо не более 2 вакуолей в области акросомы);
- постакросомальная зона имеет четкую, ровную границу с акросомой без вакуолей и просветлений;
- шейка сперматозоида имеет длину 6 – 10 мкм, ширину до 1 мкм;
- цитоплазматическая капля не более 1/3 от размера нормальной головки;
- хвост сперматозоида имеет длину 45 мкм, возможен загиб и волнообразное положение хвоста;
- отношение длины головки к длине хвоста сперматозоидов – 1:9 или 1:10.

К патологическим формам относят сперматозоиды с макро-, микро-, коническими головками, клювовидные, двуглавые, с одной шейкой и хвостом, с раздвоенными головками, без шейки, с утолщенной, изогнутой шейкой, с несколькими хвостами, без акросомы или без ядра и др. Все пограничные, субнормальные, незрелые сперматозоиды также относят к патологическим формам.

Количество сперматозоидов с нормальной морфологией, а также с

патологией шейки, головки и хвостика выражают в процентах от общего числа сперматозоидов.

У фертильных мужчин сперматозоидов нормальной формы должно быть более 4%. При патологическом сперматогенезе выявляется повышенное содержание сперматозоидов с патологией головки и тела. Патологии хвоста обычно экскреторного происхождения и возникают при прохождении сперматозоидов по семявыносящим путям.

Согласно критериям «идеального сперматозоида» эякулят классифицируют на:

- нормальный/фертильный – количество «идеальных» сперматозоидов более 14%;
- субфертильный/фертильный – количество «идеальных» сперматозоидов от 4% до 14%;
- субфертильный – количество «идеальных» сперматозоидов менее 4%.

После проведения морфологического исследования спермы проводят подсчет индексов множественных дефектов:

1. ИТЗ (индекс тератозооспермии).
2. ИДС (индекс дефектности сперматозоидов).

Индекс тератозооспермии, или индекс множественных аномалий, подсчитывается путем деления числа дефектов на число патологических сперматозоидов:

$$\text{ИТЗ} = \frac{\text{число дефектов головки} + \text{число дефектов шейки} + \text{число дефектов хвоста}}{\text{число подсчитанных патологических сперматозоидов}}$$

ИТЗ лежит в пределах от 1 до 3. При ИТЗ = 1 каждый патологический сперматозоид имеет один дефект (головки, шейки или хвоста), при ИТЗ = 3 каждый патологический сперматозоид имеет три дефекта (и головки, и шейки, и хвоста).

Индекс дефектности сперматозоидов рассчитывается путем деления числа дефектов на число всех подсчитанных сперматозоидов:

$$\text{ИДС} = \frac{\text{число дефектов головки} + \text{число дефектов шейки} + \text{число дефектов хвоста}}{\text{число подсчитанных сперматозоидов}}$$

Старые формы сперматозоидов с гиперхромией, ахромией, вакуолизацией головки появляются в семенной жидкости после продолжительного полового воздержания и непригодны для оплодотворения. В нормальном эякуляте их не более 4%.

Молодые или незрелые формы сперматозоидов имеют вокруг головки и шейки остаток цитоплазмы («воротничок» или «капюшон»), наблюдаются при частых половых сношениях и обладают низкой оплодотворяющей способностью и в норме составляют не более 2%.

В описании патологических состояний при исследовании эякулята используют определенные суффиксы: «-спермия» – в отношении патологии эякулята и «-зооспермия» – при патологии сперматозоидов. Так, например, термин «олигоспермия» означает снижение объема эякулята, а «олигозооспермия» – уменьшение количества сперматозоидов в эякуляте.

Выделяют следующие виды патологических состояний, диагностируемые в ходе исследования эякулята:

1. *Аспермия (асперматизм)* – отсутствие эякулята, может быть связана с двусторонней обтурацией семявыносящих протоков.
2. *Олигоспермия* – объем эякулята ниже нормального значения.
3. *Азооспермия* – отсутствие сперматозоидов (могут присутствовать клетки сперматогенеза).
4. *Олигозооспермия* – уменьшение количества сперматозоидов в 1 мл эякулята.
5. *Криптоспермия* – сперматозоиды отсутствуют в эякуляте, но определяются после центрифугирования.
6. *Тератоспермия* – увеличение процента патологических форм сперматозоидов.
7. *Некроспермия* – увеличение количества мертвых сперматозоидов.
8. *Акинозооспермия* – полная неподвижность сперматозоидов.
9. *Астенозооспермия* – подвижность сперматозоидов ниже нормального значения.
10. *Глобозоспермия* – отсутствие акросомы у сперматозоидов.
11. *Гемоспермия* – присутствие эритроцитов в эякуляте.
12. *Лейкоспермия* – количество лейкоцитов в эякуляте выше референтного значения.

При выявлении одновременно трех патологических состояний эякулята: олигозооспермии ($< 15 \times 10^6$ сперматозоидов/мл), астенозооспермии ($\leq 32\%$ подвижных сперматозоидов) и тератозооспермии ($< 4\%$ сперматозоидов с нормальной морфологией) делается заключение о наличии у пациента синдрома олигозоастенотератозооспермии – ОАТ-синдрома. ОАТ-синдром в сочетании с азооспермией ($< 1 \times 10^6$ сперматозоидов/мл) часто встречается при обструкции семявыносящих путей или генетических аномалиях.

Для оценки плодовитости мужчины вычисляется индекс плодовитости Фарриса, который позволяет дать более объективную оценку результата спермограммы.

$$I = \frac{V \times N \times M}{100},$$

где I – индекс плодовитости Фарриса,

V – объём эякулята в мл,

N – число сперматозоидов в млн на 1 мл,

M – процент подвижных сперматозоидов.

Сперма считается плодотворной, если индекс Фарриса выше 200.

При обследовании некоторых пациентов установление причины нарушения репродуктивной функции не представляет большой сложности, например, при азооспермии или акинозооспермии. Однако нередко для установления причин нарушения фертильности, а также для комплексной оценки различных характеристик качества спермы необходимо проведение дополнительных лабораторных исследований.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМЫ

Исследование эякулята для выяснения причины бесплодия не должно ограничиваться микроскопией. Немаловажное значение имеет исследование биохимических свойств спермы.

Поддержание функциональной активности сперматозоидов осуществляется спермоплазмой. Спермоплазма – это смесь секретов добавочных половых желез и придатков яичек. Секрет семенных пузырьков в основном содержит фруктозу; в состав секрета предстательной железы входят лимонная кислота и микроэлементы; одним из составляющих секрета придатков яичек является карнитин. Функционирование, а значит, и характеристика секретов добавочных половых желез обеспечивается андрогенными гормонами. Таким образом, количественные характеристики биохимических показателей зависят от функционирования добавочных желез и уровня тестостерона в крови.

Исследование биохимических показателей спермоплазмы проводится прежде всего для оценки работы добавочных половых желез. Среди биохимических показателей спермоплазмы клинико-диагностическое значение имеют определение концентрации цинка, фруктозы, лимонной кислоты, активности ферментов акрозина, гликозидазы и др. Немаловажное значение имеет исследование антиоксидантной активности спермоплазмы, особенно у пациентов с идиопатическим бесплодием.

Цинк (Zn) является маркером сперматогенеза и секреторной функции предстательной железы. Низкий уровень содержания Zn в эякуляте наблюдается при олигозооспермии, астенозооспермии и нарушении функции предстательной железы. В норме содержание Zn в эякуляте составляет не менее 2,4 мкмоль/мл.

На функциональную активность сперматозоидов влияет также концентрация таких микроэлементов, как железо, магний, марганец, секреция которых осуществляется предстательной железой.

Основным энергетическим субстратом для сперматозоидов является фруктоза. Образуется она в семенных пузырьках при достаточной гормональной функции клеток Лейдига. Уровень фруктозы в семенной жидкости является индикатором эндокринной тестикулярной функции и меняется в зависимости от уровня андрогенов в крови. Снижение содержания фруктозы может отмечаться при нарушении проходимости протока семенных пузырьков в результате воспалительных заболеваний, атрезии, тяжелой дисфункции семенных пузырьков или обструкции семявыбрасывающего протока. В норме содержание фруктозы в эякуляте должно быть не менее 13 мкмоль/мл.

Фруктолиз – ферментативный распад фруктозы, является основным метаболическим процессом, происходящим в семенной жидкости, поставляющим энергию для движения сперматозоидов. Фруктолиз подсчитывается путем определения первоначального количества фруктозы в эякуляте и после инкубации при 37°C в течение не менее 2 часов и оценивается по скорости снижения концентрации фруктозы в эякуляте после инкубации. Потребление фруктозы зависит от числа сперматозоидов, их подвижности и способности к фруктолизу. В норме распад фруктозы за 1 час составляет не менее 140 мкг. Уменьшение подвижности сперматозоидов и увеличение их патологических форм приводит к резкому снижению либо прекращению фруктолиза.

Для оценки фруктолиза можно использовать метод подсчета фруктолизного индекса по Вастерлингу:

$$\text{Фруктолизный индекс} = \frac{100 \times (\text{израсходованная за 1 час фруктоза})}{\text{Число сперматозоидов в 1 мл эякулята}}$$

Показатель фруктолизного индекса ниже 100 указывает на уменьшение метаболической активности сперматозоидов.

Концентрация лимонной кислоты в сперме служит показателем

функционального состояния предстательной железы и эндокринной функции яичек. В норме концентрация лимонной кислоты в семенной жидкости колеблется в диапазоне от 24,9 до 33,3 ммоль/л.

Аскорбиновая кислота выделяется семенными пузырьками. Ее содержание в спермоплазме зависит от продукции тестостерона клетками Лейдига и в норме составляет 150 – 200 мкмоль/л. При избыточном количестве аскорбиновой кислоты в эякуляте возможно снижение подвижности сперматозоидов. Сперматозоиды имеют отрицательный заряд, в результате чего не происходит их столкновение и слипание, они отталкиваются друг от друга. Сдвиг pH в кислую сторону вследствие избытка аскорбиновой кислоты приводит к снижению их электрического заряда и может вызвать агглютинацию сперматозоидов.

Источником карнитина в эякуляте являются придатки яичек и семенных пузырьков. Считается, что карнитин участвует в переносе жирных кислот через мембрану сперматозоидов и влияет на подвижность половых клеток. Содержание карнитина в спермоплазме составляет 0,47 ммоль/л.

Спермоплазма богата белками, секретируемыми в основном предстательной железой и семенными пузырьками. В норме концентрация общего белка в сперме составляет 40 – 45 г/л.

Содержание нейтральной α -глюкозидазы в сперме и семенной плазме является показателем функционирования придатков яичек. В норме ее уровень в сперме должен быть не менее 20 мЕД/мл. Низкая активность нейтральной α -глюкозидазы в семенной жидкости пациентов с олигозооспермией может отражать частичную обструкцию придатков яичка, связанную с инфекциями или воспалительным заболеванием. Также об обструктивном характере поражения придатков яичек может свидетельствовать снижение уровня нейтральной α -глюкозидазы в сперме на фоне нормального значения ФСГ в сыворотке крови и нормального объема яичек.

Кислая фосфатаза образуется в предстательной железе. Продукция ее стимулируется андрогенами. В эякуляте ее активность выше, чем в сыворотке крови, в 165 раз. Выраженное снижение активности кислой фосфатазы в сперме наблюдается при остром простатите и везикулите.

Ключевыми ферментами процесса оплодотворения являются сериновая протеиназа (акрозин) и гиалуронидаза, участвующие в акросомальной реакции. Содержание данных ферментов находится в прямой зависимости от концентрации сперматозоидов.

Биохимическим индикатором активности полиморфноядерных лейкоцитов в эякуляте служит концентрация фермента – эластазы. Верхняя

граница нормы (пороговая концентрация) эластазы в эякуляте равна 600 нг/мл.

С целью выявления влияния окислительного стресса на мужскую фертильность всем пациентам с подозрением на идиопатическое бесплодие показано определение общей антиоксидантной активности спермоплазмы.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Сперматозоиды – высоко дифференцированные клетки, несущие генетический материал, который охраняется иммунной системой от влияния различных агентов. В обычных условиях определенную степень иммунной изоляции семенных канальцев осуществляет так называемый гематотестикулярный барьер. Он блокирует с одной стороны попадание антигенов сперматозоидов в общую среду организма, с другой – внедрение иммунокомпетентных клеток в сферу репродуктивного аппарата. Барьерную функцию выполняют клетки Сертоли, оболочка семенных канальцев, эндотелий капилляров. При нарушении гематотестикулярного барьера иммунная система продуцирует антитела к сперме.

Нарушение гематотестикулярного барьера может быть вызвано травмой яичка, бактериальными или вирусными инфекциями (тестикулитом, эпидидимитом, орхитом), раком яичка, варикоцеле, крипторхидизмом, хирургическими операциями на яичке (например, вазэктомией или проведением биопсии яичка) и т.д.

Антитела к спермальным антигенам – это специфические иммуноглобулины, действие которых направлено против сперматозоидов. Связывание антиспермальных антител со сперматозоидами приводит к снижению подвижности сперматозоидов, способности проникать в слизь шейки матки и оплодотворять яйцеклетку.

В норме у здоровых людей антитела к спермальным антигенам отсутствуют, так как существуют специфические защитные механизмы, предотвращающие их появление.

Обычно в ответ на взаимодействие со сперматозоидами организм вырабатывает три разных типа антител, которые могут повлиять на состояние спермы: иммуноглобулины класса А, М и G. Показателем иммунологического бесплодия являются антиспермальные антитела классов IgA и IgG в сперме. Наибольшее диагностическое значение имеет тест на иммуноглобулины класса А, так как они в большей степени работают на поверхности слизистых и определяют иммунитет гематотестикулярного барьера. Антиспермальные антитела класса IgM в эякуляте определяются редко, что обусловлено их большой молекулярной массой.

Уровни антиспермальных антител можно определять как в эякуляте, так и в сыворотке крови. Тест на антитела к спермальным антигенам в сыворотке крови назначается главным образом женщинам. У мужчин он используется редко, в основном в качестве дополнительного исследования при невозможности выявления антител в сперме.

Для скрининга на антиспермальные антитела используют следующие методы:

- тест с иммунными шариками;
- смешанная антиглобулиновая реакция (MAR-тест [Mixed Immunoglobuline Reaction]).

Тест с иммунными шариками.

Может использоваться прямой или непрямой тест с иммунными шариками.

Прямой тест с иммунными шариками позволяет определить наличие антиспермальных антител на поверхности сперматозоидов.

Иммунные шарики – полиакриламидные сферы, покрытые антиспермальными антителами класса IgA и IgG. Сперматозоиды путем двукратного центрифугирования отделяют от спермоплазмы и соединяют с буфером. Полученную смесь смешивают с иммунными шариками, помещают под микроскоп и просматривают в нативном препарате. Оценивается количество подвижных сперматозоидов, связанных с шариками. Результат выражается в процентах (пороговое значение – 50%). В случае, если более 50% подвижных сперматозоидов связано с шариками, можно предполагать наличие значимого количества антиспермальных антител для установления диагноза «аутоиммунное бесплодие».

Непрямой тест с иммунными шариками используется редко, в основном для определения наличия антиспермальных антител в сыворотке, семенной плазме или цервикальной слизи.

Смешанная антиглобулиновая реакция (MAR-тесты).

Наиболее популярным в лабораторной практике для диагностики аутоиммунного бесплодия является MAR-тест. Он удобен, прост и не требует дополнительных манипуляций в виде центрифугирования спермы и смешивания с буфером. Выделяют MAR-тест прямой (проводится при наличии в эякуляте активно-подвижных сперматозоидов) и непрямой (при отсутствии активно-подвижных сперматозоидов, проводится с использованием сперматозоидов донора).

При постановке MAR-теста смешивают нативный эякулят либо с латексными частичками, содержащими специфические антитела, либо с латексными частичками и специфическими антителами. Результат теста

оценивается путем подсчета подвижных сперматозоидов, покрытых латексными частичками, по отношению к общему количеству подвижных сперматозоидов – сначала через 2 – 3 минуты после соединения всех компонентов, а затем через 10 минут. Если через 3 минуты 100% подвижных сперматозоидов окажутся «связанными», то такой результат учитывается сразу – без повторного подсчета. Если менее 100% подвижных сперматозоидов через 3 минуты свяжутся с частичками, слайд необходимо пересмотреть через 10 минут. Если сперматозоиды утратят подвижность через 10 минут, за результат теста следует принимать данные, полученные на 10-й минуте. Связывание латексных частиц с кончиками хвостов сперматозоидов не обязательно является признаком нарушения фертильности, и может встречаться у здоровых мужчин

Пороговое значение MAR-теста составляет 50%: в случае, если более 50% подвижных сперматозоидов покрыто латексными частичками, можно говорить о наличии в эякуляте антиспермальных антител.

Выявление антиспермальных антител в эякуляте указывает на снижение вероятности спонтанного зачатия. Установлено, что пациенты, у которых присутствуют антиспермальные антитела класса IgA и IgG, или только антитела класса IgA, имеют очень маленький шанс зачатия естественным способом.

При необходимости антиспермальные антитела выявляются в сыворотке крови методом ИФА.

ДНК-ФРАГМЕНТАЦИЯ

Генетические факторы – одна из частых причин аномалий развития и нарушения функций органов репродукции. Около 30% случаев тяжелых форм бесплодия у мужчин связано с генетическими факторами. Пациентам с азооспермией, олигозооспермией тяжелой и средней степени тяжести, олигоастенотератозооспермией, не поддающейся консервативной терапии на протяжении длительного времени, показано проведение молекулярно-генетического исследования. Также необходимо молекулярно-генетическое обследование в том случае, когда у женщины наблюдались привычные невынашивания беременности и имеются подозрения на генетические и хромосомные нарушения – в таких случаях обязательно обследовать как женщину, так и мужчину.

Комплексное молекулярно-генетическое тестирование позволяет установить наследственную природу нарушений сперматогенеза, корректировать терапевтические подходы, избегая излишнего лечения, прогнозировать целесообразность получения сперматозоидов для ИКСИ

(интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку) и ЭКО (экстракорпорального оплодотворения), оценить для потомства мужского пола риск наследования репродуктивных проблем отца.

Скрининговым методом оценки возможного влияния генетического фактора на фертильность мужчин является оценка фрагментации ДНК сперматозоидов.

На количественном составе эякулята повышенный уровень фрагментации ДНК практически не сказывается. Установлена прямая корреляция между количеством сперматозоидов с фрагментированной ДНК и процентом их патологических форм и обратная зависимость – с подвижностью сперматозоидов.

Целостность цепочки ДНК сперматозоидов после оплодотворения рассматривается как один из основополагающих факторов нормального развития беременности. Точный анализ качества ДНК сперматозоидов, степень и динамика ее деградации дает важную информацию, дополняющую спермограмму. Фрагментация ДНК сперматозоидов может быть следствием как внутренних (мутации, влияющие на компактизацию молекулы ДНК), так и внешних факторов (ионизирующее излучение, гонадотоксины, воздействия повышенных температур, окислительный стресс, инфекции). Кроме того, причиной для повышенной фрагментации ДНК в сперматозоидах может быть курение, варикоцеле, эндокринные нарушения.

Согласно данным рекомендаций Европейской ассоциации урологов и Американского общества по репродуктивной медицине, повышенный уровень фрагментации ДНК сперматозоидов может приводить к снижению вероятности самостоятельного зачатия в паре. Однако нельзя однозначно утверждать, что увеличение количества фрагментированной ДНК будет препятствовать развитию беременности после искусственной инсеминации или экстракорпорального оплодотворения. Тест на фрагментацию ДНК целесообразно назначать при наличии «замерших» беременностей у партнерши и неудачных попыток достижения беременности методами вспомогательных репродуктивных технологий до проведения дорогостоящих и сложных молекулярно-генетических исследований.

Основными методиками для определения фрагментации ДНК являются:

- TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) – анализ терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазной dUTP-метки,
- СОМЕТ – метод гель-электрофореза отдельных клеток или метод ДНК-комет,

- SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) – анализ структуры хроматина сперматозоида, COMET, SCSA.

Самым простым и доступным способом оценки ДНК-фрагментации сперматозоидов является метод, основанный на дисперсии хроматина сперматозоидов с последующей окраской и визуализацией под микроскопом.

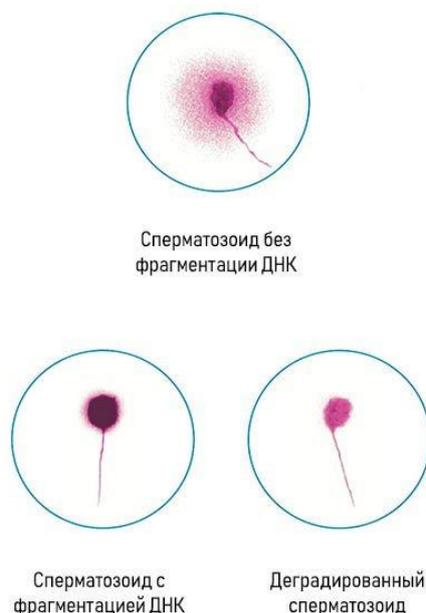


Рис. 12 – Сперматозоиды с различной степенью фрагментации ДНК
Методика определения ДНК-фрагментации:

Принцип метода состоит в том, что после специальной обработки сперматозоидов, заключающейся в денатурации и удалении ядерных белков, сперматозоиды с фрагментированной ДНК не создают характерный ореол (гало) диспергированных петель ДНК, который наблюдается у сперматозоидов с нефрагментированной ДНК. Изображения гало можно оценивать как с помощью обычного светового микроскопа, так и с использованием флуоресцентного микроскопа.

Интактную нефиксированную сперму погружают в инертный агарозный микрогель, полученную смесь помещают на специальное предметное стекло. После чего мазок обрабатывается сначала денатурирующим раствором, который денатурирует ДНК в сперматозоидах с фрагментированной ДНК, затем – лизирующим раствором, который удаляет большинство ядерных белков. Препарат промывается и фиксируется (70% и 100% этанолом). Для визуализации используют растворы для окрашивания эозином и тиразином. При наличии массивных разрывов ДНК нуклеотиды из сперматозоидов с фрагментированной ДНК либо не показывают ореола (гало) дисперсии, либо ореол (гало) минимальный (рис.12).

Подсчитывается минимум 300 сперматозоидов с градацией на группы:

1. Сперматозоиды без фрагментации ДНК:

- половые клетки с большим ареолом – ширина гало \geq диаметра ядра половой клетки,

- половые клетки с гало среднего размера.

2. Сперматозоиды с фрагментированной ДНК:

- сперматозоиды с малым гало – ширина гало $\leq 1/3$ диаметра ядра,

- сперматозоиды без гало,

- сперматозоиды без гало и деградированные (нет гало и ядро неравномерно окрашено).

Индекс фрагментации сперматозоидов подсчитывается по формуле:

$$\text{Индекс фрагментации} = \frac{\text{кол-во фрагментированных сперматозоидов} + \text{кол-во деградированных сперматозоидов}}{\text{общее число подсчитанных сперматозоидов}} \times 100\%$$

Референтные значения индекса фрагментации ДНК сперматозоидов (SDFI – sperm DNA fragmentation index):

- низкий SDFI <15%;

- средний SDFI 15-30%;

- высокий SDFI > 30%.

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕКРЕТА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Предстательная железа состоит из 30 – 50 трубчато-альвеолярных желез. Выводные протоки простаты открываются в мочеиспускательный канал на пересечении мочевыделительного и семявыносящего трактов, поэтому предстательная железа легко вовлекается в воспалительные процессы. Основной функцией предстательной железы является выработка секрета, необходимого для поддержания жизнедеятельности сперматозоидов после эякуляции. У мужчин зрелого возраста в норме простата продуцирует за сутки от 0,1 до 3 мл секрета.

Для лабораторного исследования отделяемое простаты получают путем массажа железы после 4 – 5-дневного полового воздержания и предварительного мочеиспускания – для предупреждения присоединения к секрету простаты отделяемого уретры.

Можно исследовать осадок мочи, полученной после массажа простаты, поскольку секрет простаты нередко затекает в мочевой пузырь.

Нормальный секрет предстательной железы – это густая вязкая мутная жидкость со специфическим запахом, который обусловлен спермином, и слабощелочной реакцией (pH 7,6 – 8,4).

Микроскопическое исследование секрета простаты заключается в предварительном просмотре нативного препарата, для чего каплю секрета помещают на предметное стекло и покрывают покровным. Если исследуется моча, полученная после массажа простаты, ее центрифугируют, и из осадка готовят нативные препараты. При необходимости готовят мазки и окрашивают их по Романовскому или метиленовым синим.

При микроскопическом исследовании обращают внимание на наличие лейкоцитов, амилоидных, липоидных телец, эпителиальных клеток и др.

Лейкоциты: в нативном препарате в норме выявляется от 0 до 10 лейкоцитов в поле зрения. Количество их увеличивается при воспалительных процессах. На увеличение количества лейкоцитов влияет ряд факторов (техника массажа, примесь содержимого уретры, сексуальная активность и др.).

Эритроциты в нормальном секрете единичные, попадают в секрет при энергичном массаже предстательной железы. Увеличение количества эритроцитов наблюдается при воспалительных процессах или новообразованиях.

Эпителиальные клетки в норме встречаются редко. Выводные протоки предстательной железы выстланы цилиндрическим и частично переходным эпителием. Десквамация эпителия резко увеличивается при воспалительных процессах и опухолях. Эпителиоциты имеют вид круглых клеток с признаками жировой дистрофии, встречаются вместе с лейкоцитами.

Амилоидные тельца (конкременты, гиалиновые шары) представляют собой сгущенный секрет железы, имеют овальную или округлую форму, слоистое строение, желтоватый цвет и круговую исчерченность (подобно спилу дерева). Наличие амилоидных телец указывает на застой секрета в железе, что может иметь место при хронических воспалительных процессах, аденомах, гипертрофии предстательной железы у лиц пожилого возраста.

Липоидные тельца (лецитиновые зерна) – мелкие белесоватые преломляющие свет образования, специфический продукт секреции эпителия предстательной железы, которые придают секрету молочный вид. В нормальном секрете находятся в большом количестве. Уменьшение их количества наблюдается при простатитах, при злокачественных опухолях их число резко уменьшается вплоть до полного исчезновения.

Кристаллы Беттхера (кристаллы спермина) – бесцветные, удлиненной призматической формы кристаллы, образуются из фосфорнокислой соли и спермина. Красятся в синий цвет при добавлении раствора Люголя. Кристаллы спермина появляются в секрете при простатите.

При аденоме предстательной железы наблюдается ретенционный

синдром (застой). В застоявшемся секрете выявляются макрофаги, многоядерные клетки типа инородных тел и амилоидные тельца, кристаллы холестерина.

При распаде опухоли простаты можно обнаружить элементы злокачественного новообразования, которые дифференцируются по характерным морфологическим признакам злокачественности. Опухолевые клетки чаще встречаются в виде комплексов.

Простым и доступным методом оценки андрогенной насыщенности организма является определение феномена кристаллизации секрета простаты. Для его определения капля полученного после массажа секрета наносится на предметное стекло. После добавления к ней капли физиологического раствора и высушивания на воздухе, препарат рассматривают при малом увеличении микроскопа. Оценка андрогенной насыщенности организма проводится в соответствии с полученным рисунком кристаллизации:

1. Типичный «лист папоротника» (+++) указывает на нормальную андрогенную насыщенность.

2. Ветви листа папоротника истончены, отсутствуют поперечные ветвления, боковые ветви отходят от основной под углом (++) – умеренная гипоандрогения.

3. Полное отсутствие поперечных ветвлений, деформация и утолщение кристаллов (+) – выраженная гипоандрогения.

4. Отдельные утолщенные деформированные кристаллы (-) характерны для резко выраженной андрогенной недостаточности.

В последнее время исследование феномена кристаллизации сока предстательной железы проводят крайне редко.

В случаях, когда необходимо определение бактериальной флоры, проводится бактериоскопическое и бактериологическое исследование секрета предстательной железы, которое имеет не только диагностическое значение, но и играет существенную роль в проведении рациональной антибактериальной терапии с последующим ее контролем в динамике.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫОсновная:

1. Шатохина, И. С. Исследование эякулята : учеб. пособие / И. С. Шатохина, В. С. Кузнецова. – Москва, 2014. – 20 с.
2. Камышников, В. С. Клиническая лабораторная диагностика соматических заболеваний / В. С. Камышников. – Мн.: Адукацыя і выхаванне, 2014. – 464 с.
3. Камышников, В. С. Лабораторная диагностика в клинической практике врача : учеб. пособие / В. С. Камышников. – Мн. : Адукацыя і выхаванне, 2018. – 632 с.
4. Лабораторная диагностика мужского бесплодия / В. В. Долгов [и др.] ; под ред. В. В. Долгова. – М.–Тверь : Триада, 2006. – 145 с.
5. Методы клинических лабораторных исследований / В. С. Камышников [и др.] ; под ред. В. С. Камышникова. – 10-е изд. испр. – М. : МЕДпресс-информ, 2020. – 736 с.
6. Ниткин, Д. М. Мужское бесплодие : методы диагностики и консервативного лечения : учеб. пособие / Д. М. Ниткин [и др.] – Мн.: БелМАПО, 2016. – 43 с.
7. Норма в лабораторной медицине : справочник / В. С. Камышников. – 2-е изд. – М. : МЕДпресс-информ, 2014. – 334 с.
8. Общеклинические исследования: моча, ликвор, эякулят / И. И. Миронова, М. Л. Романовой, В. В. Долгова ; под ред. И. И. Мироновой. – М.–Тверь : Триада, 2008. – 204 с.
9. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пятое издание. / пер. с англ. Н.П. Макарова. – М. : Капитал принт, 2012г. – 291 с.
10. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – 3-е изд. испр. – М. : МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с.
11. Тиц, Н. У. Клиническое руководство по лабораторным тестам / пер. с англ. под ред. В. В. Меньшикова. – М. : ЮНИМЕД-пресс, 2013. – 960 с.

Дополнительная:

12. Михайличенко, В. В. Диагностика бесплодия у мужчин : метод. рекомендации / В. В. Михайличенко, Г. Н. Скрябин. – Ленинград, 1987. – 24 с.
13. Юнда, И. Ф. Клиника и диагностика простатита : метод. рекомендации / И. Ф. Юнда [и др.] – Киев, 1978. – 28 с.
14. Базарнова, М. А. Лабораторная диагностика мужского бесплодия : метод. рекомендации / М. А. Базарнова [и др.] – Москва, 1979. – 32 с.

Учебное издание

Батуревич Людмила Викторовна
Шилейко Ирина Дмитриевна
Алехнович Лариса Игоревна

ИССЛЕДОВАНИЕ ОТДЕЛЯЕМОГО МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ

Учебно-методическое пособие

В авторской редакции

Подписано в печать 30.12.2021. Формат 60x84/16. Бумага «Discovery».

Печать ризография. Гарнитура «Times New Roman».

Печ. л. 2,25. Уч.- изд. л.2,01. Тираж 120 экз. Заказ 89.

Издатель и полиграфическое исполнение –
государственное учреждение образования «Белорусская медицинская
академия последипломного образования».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/136 от 08.01.2014.

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 3/1275 от 23.05.2016.

220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, кор.3.