

Министерство здравоохранения Московской области
Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
Московской области
Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского
Факультет усовершенствования врачей

«УТВЕРЖДАЮ»
Декан факультета
усовершенствования врачей
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского
профессор **Б.В. Агафонов**
Протокол №3 от 27.11. 2013 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЯКУЛЯТА

Учебное пособие

Москва
2014

Учебное пособие посвящено одному из видов лабораторного анализа – исследованию эякулята. Основной целью данного исследования является оценка качества сперматозоидов для определения их потенциальной способности к оплодотворению яйцеклетки и поиска возможных причин бесплодия для последующей выработки метода его лечения.

Пособие предназначено для врачей клинической лабораторной диагностики, урологов и студентов медицинских институтов.

Авторы:

И.С. Шагохина, канд. мед. наук

В.С. Кузнецова

Рецензенты:

А.П. Морозов, врач-уролог МОНКИ им. М.Ф. Владимирского,
д-р мед. наук

Л.А. Дасаева, врач-нефролог РНИМУ им. Н.И. Пирогова «НКЦ геронтологии», д-р мед. наук

ISBN 978-5-98511-227-6



МОНИКИ

ЭЯКУЛЯТ

Эякулят является продуктом деятельности двух систем:

- яичек, вырабатывающих «концентрат» сперматозоидов, составляющий 2-5% от объема эякулята;
- группы желез, вырабатывающих семенную жидкость (секрет простаты, составляющий 25-35%, секрет семенных пузырьков – 50-60%, пара- и бульбоуретральных желез – 5-10%).

Выброс содержимого секреторных желез и «концентрата» сперматозоидов из дистального отдела семявыносящих протоков происходит в просвет уретры. Далее в результате мышечных сокращений уретры эякулят перемешивается с её содержимым (слизь, выделения пара- и бульбоуретральных желез; клетки, слущенные со стенок уретры), затем происходит порционный выброс сформировавшегося эякулята. В первых порциях эякулята находится наибольшее количество сперматозоидов.

СПЕРМАТОГЕНЕЗ

Центральным звеном репродуктивной системы мужского организма являются семенники, в которых происходит «рождение» мужской гаметы – сперматозоида и вырабатывается основной андроген – тестостерон. Сперматогенез – сложный, продолжительный динамический процесс, в результате которого стволовой сперматогоний через серию преобразований становится зрелой, полностью дифференцированной подвижной гаметой – сперматозоидом. Этот процесс является непрерывным в течение репродуктивной жизни индивида и осуществляется внутри извитых семенных канальцев. Семенные канальцы – сложно построенные структуры, состоящие из пограничной мембраны, опорных клеток Сертоли и герминативных клеток, находящихся на разных стадиях развития (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды).

Сперматогенез можно подразделить на три основные фазы. Начальной фазой является пролиферация, в течение которой из стволового сперматогония в результате митоза продуцируются дополнительные стволовые клетки и дифференцирующиеся сперматогонии. В ходе данной фазы последние непрерывно воспроизводят собственную популяцию клеток и обеспечивают рождение сперматоцитов. Вторая фаза характеризуется тем, что сперматоциты проходят редукционное деление (мейоз), в результате которого появляются сперматиды. Третья фаза – спермиогенез – включает дифференцировку вновь сформированных сперматид в сперматозоиды, которые «дозревают» в процессе прохождения через придаток семенника.

Весь процесс сперматогенеза занимает порядка 60 дней, а прохождение через придаток – около 14. Основную роль в регуляции данного

процесса выполняют гормоны аденогипофиза – лютеинизирующий и фолликулостимулирующий. Кроме этого существуют, очевидно, и внутритестикулярные паракринные и аутокринные механизмы регуляции.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЭЯКУЛЯТА

Вследствие высокой специфичности исследование эякулята должно проводиться специально обученным, прошедшим подготовку лаборантом и врачом клинической лабораторной диагностики. Уровень и объем проведения исследования зависят от конкретной задачи, поставленной лечащим врачом перед врачом-клиницистом. Например, если эякулят получен для исключения воспалительных заболеваний простато-везикулярного комплекса, то достаточно лишь проведения морфологического исследования клеточного состава с определением в нем количества и концентрации лейкоцитов. С другой стороны, отклонения от нормальных показателей вне основной цели исследования (случайные находки) должны быть обязательно зафиксированы и доведены до сведения врача-клинициста.

Могут быть проведены следующие виды исследований эякулята: клинические, биохимические, бактериологические, иммунологические. В данном пособии мы остановимся на клинических аспектах исследования семенной жидкости.

ПОЛУЧЕНИЕ ЭЯКУЛЯТА

При направлении пациента на спермограмму врач обязан подробно объяснить, какие условия подготовки должны быть выполнены перед исследованием для получения достоверного результата:

- не употреблять алкоголь в любых количествах в течение 6-7, а лучше 10 дней;
- воздержаться от семяизвержений в течение 2-4 суток;
- накануне исключить тяжёлые физические нагрузки, конфликтные ситуации, ночью рекомендуется обеспечить себе полноценный отдых;
- постараться исключить в течение 2,5 месяцев токсические факторы, гипертермию;
- при наличии воспалительных заболеваний уретры и/или простато-везикулярного комплекса рекомендуется перед исследованием провести санацию и выждать не менее двух недель;
- перед получением эякулята помочиться (смыть мочой содержаемое мочеиспускательного канала), затем помыть руки и обмыть половые органы с мылом;
- образцы спермы с помощью мастурбации собрать в стеклянный или пластиковый идеально чистый (а для бактериологического исследования – стерильный) градуированный контейнер с широким горлом.

МАКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЯКУЛЯТА

Обязательным при макроскопическом исследовании является определение следующих параметров.

1. Консистенция. Сперма, полученная при эякуляции, густая и вязкая. Под влиянием ферментов предстательной железы через 10-60 минут эякулят здорового мужчины при комнатной температуре разжижается. Если в течение 60 минут он остаётся вязким, можно думать о воспалении предстательной железы. Вязкая консистенция спермы препятствует движению сперматозоидов. Кроме того, в сперме могут встречаться тяжи слизи, конгломераты, комочки прозрачного, белого, желтого, коричневатого, сероватого цвета, включающие в себя различные клеточные элементы.

2. Вязкость. Определяется длиной растяжения нити между стеклянной палочкой и поверхностью эякулята через 1 час после его разжижения; в норме не должна превышать 20 мм.

3. Объем. Определяется сразу же после разжижения в доставленном контейнере, если он градуирован. Если на контейнере градуировки нет, содержимое переливается в градуированную центрифужную пробирку. В норме объём эякулята составляет 2-6 мл, максимальный объём может достигать 15 мл. Объём эякулята не влияет на фертильность.

4. Цвет. Нормальная семенная жидкость серовато-белого или молочного цвета, слегка опалесцирует. Значительно повышенное количество лейкоцитов (пиоспермия) может придать ей желтоватый оттенок, наличие эритроцитов (гематоспермия) – красноватый, отсутствие сперматозоидов может повысить её прозрачность.

5. Запах эякулята напоминает запах каштанов, что обусловлено наличием в нем сперминов. Гнилостный запах может появиться при длительном хранении за счет размножения микрофлоры.

6. Реакция (pH). Реакция спермы в норме слабощелочная или щелочная. Резкощелочная реакция свидетельствует о патологии предстательной железы. При закупорке семявыносящих протоков обоих семенных пузырьков отмечается кислая реакция спермы. Определяют pH сразу после разжижения спермы с помощью индикаторных полосок по стандартным методикам.

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЯКУЛЯТА

Стандартное микроскопическое исследование эякулята проводится через 1 час после получения материала (динамическое – через 3, 6 и 24 часа). Для первичной оценки следует провести 2 исследования с интервалом не менее 7 дней, но не более трёх недель. Если их результа-

ты заметно различаются, нужно собрать третий образец, т.к. содержание сперматозоидов в семенной жидкости – величина непостоянная. В случае низкой подвижности сперматозоидов (меньше 25%) интервал между сбором и анализом должен быть как можно короче.

Очень важно поддерживать постоянный температурный режим в течение всего времени проведения исследования (доставка, фасовка, хранение, разведение, микроскопия, в т.ч. динамическое исследование). Хранить сперму следует в термостате при 37 °С, чтобы избежать отрицательного воздействия холода на подвижность сперматозоидов.

Микроскопическое исследование семенной жидкости включает в себя изучение в нативном препарате подвижности сперматозоидов, подсчёт их количества в камере Горяева, изучение морфологии сперматозоидов, клеток сперматогенеза и дифференциальную диагностику живых и мёртвых сперматозоидов в окрашенных препаратах.

Микроскопическое исследование нативного препарата проводится на предметном стекле или в камере Горяева стандартными световыми микроскопами со спущенным конденсором.

Начальное микроскопическое исследование

Просмотр эякулята на стекле – это только ориентировочное исследование, требующее дальнейшего уточнения. Оно осуществляется следующим образом: на чистое, обезжиренное предметное стекло (предварительно согретое до температуры хранения эякулята) наносится капля эякулята (10 мкл), которая слегка распределяется до получения тонкого слоя (в толстой капле хуже просматривается клеточный состав). Для создания тонкого слоя необходимо покрыть каплю покровным стеклом, не прижимая. Приготовленный препарат стабилизируется 1 минуту, затем просматривается в микроскопе с окулярами ×7 или ×10 и объективами ×8, ×10 или ×20 со спущенным конденсором и открытой диафрагмой. Оценивается клеточный состав эякулята, примерная подвижность сперматозоидов, их морфология, наличие агглютинации, агрегации, слизи, присутствие «круглых клеток» (эритроцитов, лейкоцитов, клеток сперматогенеза, эпителия), элементов сока простаты, кристаллов Беттхера.

При микроскопическом исследовании обязательной является оценка следующих параметров.

1. Агглютинация сперматозоидов. Скопление подвижных сперматозоидов без каких-либо клеток свидетельствует об агглютинации. В норме у практически здоровых пациентов агглютинации сперматозоидов нет. Степень данного показателя оценивается полуколичественно:

«-» – отсутствие;

«+» – слабо выраженная: в нативном препарате до 10 кучек сперматозоидов по 4-6 в каждой;

«++» – значительная: в препарате более 20 кучек сперматозоидов по 4-8 в каждой;

«+++» – резко выраженная: в препарате более 20 кучек, в каждой более 20 сперматозоидов;

«++++» – тяжёлая степень: все подвижные сперматозоиды находятся в состоянии агглютинации.

2. Агрегация сперматозоидов. Скопление неподвижных сперматозоидов свидетельствует об агрегации. Небольшие скопления неподвижных клеток часто присутствуют в семени здоровых мужчин, и это является нормальным, в то время как большие скопления, содержащие сотни сперматозоидов, – патология.

3. Слизь является содержимым предстательной железы и семенных пузырьков, в нормальном эякуляте отсутствует. В большом количестве попадает в эякулят при простатите или везикулите. Она плотно обволакивает сперматозоиды, замедляя их подвижность и скоростные параметры, искажает точное определение количества и концентрации сперматозоидов.

4. Лецитиновые зёрна (липоидные тельца) – это мелкие блестящие зёрнышки, содержащиеся в нормальной сперме в большом количестве. При воспалении их количество значительно уменьшается или они исчезают совсем.

5. Амилоидные тельца (гиалиновые шары) – крупные округлые образования с концентрическими дугами и окружностями, появляющимися при изменении глубины резкости, служат следствием застойных явлений в предстательной железе.

6. Кристаллы спермина (Беттхера) могут быть ромбовидной или друзообразной формы, различных размеров. Образуются при охлаждении спермы из спермина и фосфорнокислых солей. Встречаются через 1 час после получения эякулята крайне редко, при суточном исследовании – гораздо чаще. С количественными и качественными показателями эякулята напрямую не связаны.

Кроме того, эякулят содержит другие клетки, которые определяются как «круглые». Они включают в себя клетки сперматогенеза, лейкоциты, эритроциты, макрофаги, остатки цитоплазмы (остаточные тельца) и эпителиальные клетки, чаще из уrogenитального тракта.

Оценка подвижности сперматозоидов (кинезиограмма)

При проведении исследования обязательно должен соблюдаться принцип термостабильности.

Оценка подвижности проводится в двух каплях семени, в каждой из которых рассматривается по 100 сперматозоидов. Если различие в количестве подвижных сперматозоидов в этих каплях составляет больше

10%, готовят третий препарат, снова оценивают подвижность, после чего среднее значение рассчитывают по трём препаратам.

Сперматозоиды традиционно оцениваются по следующим категориям:

- А – быстрое поступательное движение;
- В – медленное или вялое поступательное движение;
- С – непоступательное движение (колебательное или маятникообразное, манежное);
- D – неподвижные сперматозоиды.

Для оценки подвижности в окуляр $\times 10$ или $\times 15$ вкладывают *окошко Фонио* и с объективом $\times 40$ подсчитывают сперматозоиды. В первую очередь оцениваются сперматозоиды А, в следующие 5 секунд – проходящие через окошко Фонио малоподвижные сперматозоиды В, затем С. В конце просмотра подсчитываются сперматозоиды D. Для набора 100 сперматозоидов анализируют несколько полей. Если сперматозоидов мало, подсчёт проводят без окошка Фонио. При наличии в препарате агглютинации или агрегации, в которые вовлечены 10-15% сперматозоидов, оценка подвижности проводится только по свободным формам.

Для оценки подвижности сперматозоидов также может применяться камера Горяева. Для этого сперму с помощью полуавтоматических дозаторов разводят в 20 раз физиологическим раствором (исследуемый эякулят в количестве 0,02 мл разводится в 0,4 мл подогретого физиологического раствора), который перед использованием разогревают до температуры термостатирования эякулята. Разведение эякулята проводится многократным пипетированием, при этом необходимо кусочком бинта убирать остающуюся каплю эякулята с кончика наконечника дозатора для более точного получения нужного объёма. Камеру Горяева перед исследованием тщательно протирают кусочком чистого бинта, слегка смоченного в 96° спирте. Также необходимо обработать и покровное стекло.

Разведение эякулята в физиологическом растворе, пипетирование, заливание его в камеру Горяева являются травмирующими факторами и сами по себе приводят к снижению качественных параметров сперматозоидов.

Нельзя проводить микроскопическое исследование непосредственно после заливания в камеру разведённого эякулята, необходимо дать возможность механически «травмированным» сперматозоидам восстановить подвижность. Оптимальным является проведение исследования через 0,5-1 минуту после внесения эякулята в камеру Горяева.

В камере смотрят только неподвижные и малоподвижные сперматозоиды. Расчёт ведут по формуле:

$$X=A-(B+C),$$

где А – общее количество сперматозоидов;
В – количество малоподвижных сперматозоидов;
С – количество неподвижных сперматозоидов.

Отсюда количество активноподвижных сперматозоидов составляет (Y):

$$Y = \frac{X \times 100}{A} .$$

Ответ выдаётся в процентах.

Подвижность сперматозоидов в норме регистрируется при их количестве:

- с нормальной подвижностью – более 50% (группы А + В):
 - с поступательным быстрым движением (группа А) – 25% и более;
 - с поступательным медленным движением (группа В) – 25% и менее;
- с маятникообразным движением и неподвижных (С+D) – 50% и менее.

При комнатной температуре сперматозоиды сохраняют подвижность в течение 12-24 часов, при этом в первые 2 часа подвижность не снижается, к концу 5-го часа уменьшается примерно в 2 раза.

Подсчёт количества сперматозоидов и других форменных элементов спермы в 1 мл эякулята

Для подсчёта общего количества сперматозоидов используют разводящую жидкость для их обездвиживания. В этих целях можно применять:

- раствор Барбагалло (7 мл 40% формалина и 93 мл 0,85% раствора NaCl);
- 3% раствор уксусной кислоты;
- 10% раствор карболового фуксина;
- 1% раствор синьки.

Так как эякулят имеет повышенную вязкость, для взятия точного объёма следует использовать стеклянные пипетки, поскольку автоматические семплеры с коническим наконечником могут привести значительную погрешность при работе с вязкими растворами. Рекомендуются следующие варианты разведения спермы в пробирке:

- 20 мкл спермы + 0,4 мл фиксирующей жидкости (разведение 1:20);
- 20 мкл спермы + 0,8 мл фиксирующей жидкости (разведение 1:10);
- 20 мкл спермы + 1,6 мл фиксирующей жидкости (разведение 1:5).

Если сперма богата сперматозоидами, её разводят в 10 раз. Проводится подсчёт сперматозоидов в 5 больших квадратах камеры Горяева, расположенных по диагонали (для получения более точного результата при неравномерном распределении клеточных элементов). Лучше использовать большие квадраты, разделённые пересекающимися линиями на 16 маленьких. Это важно при очень большом количестве клеток, которые проще считать послойно по маленьким квадратам, чем в одном большом. Если сперматозоид расположен на границе квадрата, то он учитывается по расположению его головки (внутри квадрата – считается, вне квадрата – не считается). Расчёт ведут по формуле:

$$X = \frac{A \times 250 \times 10 \times 1000}{5} = A \times 500\,000,$$

где А – количество сперматозоидов в 5 квадратах;

250 – 1/250 – объём одного большого квадрата камеры Горяева;

10 – степень разведения спермы,

1000 – содержание спермы в 1 мл эякулята;

5 – количество квадратов, в которых подсчитаны сперматозоиды.

Если количество сперматозоидов в эякуляте очень большое (полизооспермия), сперму разводят в 20, 50 или 100 раз.

В расчётах учитывают степень разведения:

$X = A \times 1\,000\,000$ при разведении в 20 раз;

$X = A \times 2\,500\,000$ при разведении в 50 раз;

$X = A \times 5\,000\,000$ при разведении в 100 раз.

Если в эякуляте количество сперматозоидов значительно снижено, в 1 мл для их обездвиживания добавляют 2 капли раствора Барбагалло, тщательно перемешивают, заполняют камеру и считают сперматозоиды в 5 больших квадратах. Расчёт ведут по формуле:

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

Если сперматозоиды единичные в поле зрения при исследовании нативного препарата, их также обездвиживают, добавляя в 1 мл эякулята 2 капли раствора Барбагалло, заполняют камеру Горяева и подсчитывают в 100 больших квадратах (как лейкоциты). Расчёт ведут по формуле:

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

Если сперматозоидов очень мало (менее 1-2 в поле зрения при $\times 400$), рекомендуется центрифугировать эякулят в течение 15 минут. Со ско-

ростью 1500 об/мин следует удалить надосадочную семенную плазму, измерить её объём, подсчитать количество сперматозоидов в счётной камере Горяева и оценить их подвижность. В бланке-ответе отметить, что сперма была подвергнута центрифугированию, т.к. этот процесс влияет на подвижность и морфологию сперматозоидов.

Общее количество сперматозоидов в эякуляте

Количество сперматозоидов в эякуляте рассчитывают, умножая количество в 1 мл спермы на весь объём материала. Например, объём доставленной спермы – 5 мл, количество сперматозоидов в 1 мл эякулята – 30 000 000 : 30 000 000 × 5 = 150 000 000 в доставленной сперме.

Морфология сперматозоидов

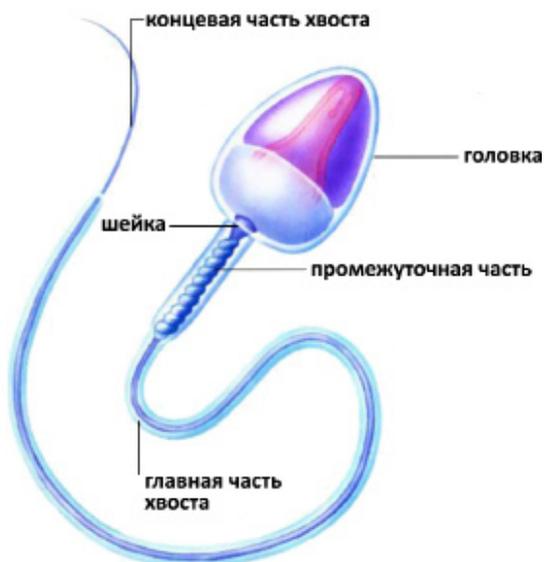
Традиционное исследование морфологии сперматозоидов проводится путём микроскопирования нативного прижизненного препарата (увеличение ×400). Использование такого метода не позволяет оценить многие морфологические изменения в структуре сперматозоида. В последние годы были предложены новые более детальные методы анализа, основанные на приготовлении препаратов эякулята с последующим их окрашиванием красителями, позволяющими чётко различать структуру клеток. Это дало возможность не только детально характеризовать морфологическую структуру сперматозоида, но также дифференцировать лейкоциты и клетки герминативного эпителия от других «круглых клеток». Такие методы позволяют выявить аномалии, неразличимые при стандартном анализе.

В лабораториях нашей страны для окраски препаратов, приготовленных из спермы, применяют унифицированные гематологические методы – окрашивание по Нохту, Романовскому–Гимзе или Паппенгейму–Крюкову. В большинстве андрологических лабораторий используется метод окраски по Папаниколау.

Для исследования морфологической структуры сперматозоидов из свежей спермы готовятся два препарата. При концентрации сперматозоидов около 20×10^6 клеток/мл или выше для мазка можно взять 5 мкл спермы. Если концентрация менее 20×10^6 клеток/мл, на предметное стекло помещается 10-20 мкл спермы, которая равномерно распределяется по стеклу. При очень низкой концентрации (менее 10×10^6 клеток/мл) препараты готовятся из осадка, полученного после центрифугирования спермы. Хорошие препараты для окрашивания получить трудно, поскольку разная вязкость приводит к неравномерному распределению сперматозоидов. Поэтому при наличии большой вязкости семя может быть промыто физиологическим раствором, отцентрифугировано, супернатант отбро-

шен. Осадок необходимо ресуспензировать до концентрации, удобной для получения препарата.

Окрашенные препараты анализируются с иммерсионным маслом под объективом $\times 100$. Переходя от поля к полю, анализируется каждый из 100, а лучше из 200 сперматозоидов для уменьшения их вариабельности. Оценивается процентное соотношение в эякуляте морфологически нормальных и измененных сперматозоидов (в целом и по отдельным видам изменений). У каждого сперматозоида характеризуются строение головки, состояние акросомы, наличие цитоплазматической капли, дефектов средней части и хвоста (см. рисунок).



Строение сперматозоида

По критерию ВОЗ головка нормального сперматозоида должна быть овальной формы и иметь длину 4,0-5,5 мкм, ширину 2,5-3,5 мкм, отношение длины к ширине 1,5-1,75. Средняя часть должна быть тонкой, около 1 мкм шириной и в 1,5 раза длиннее головки, хвост – прямым, тоньше средней части и около 45 мкм длиной. Свёрнутый хвост может свидетельствовать о низкой подвижности сперматозоидов, а при их большом скоплении – о гипоосмотическом стрессе. Цитоплазматическая капля у нормального сперматозоида не должна превышать 0,3 длины головки.

Кроме оценки морфологии, согласно строгим критериям, необходимо обращать внимание на состояние акросомальной области. Нормальная акросома должна быть хорошо определяемой и занимать от 40 до 70%

головки. Головка сперматозоида может классифицироваться как нормальная только в том случае, если она имеет нормальную акросому. Все остальные формы сперматозоидов считаются морфологически аномальными.

Патологические формы сперматозоидов

Дефекты головки: головки большие, маленькие, конические, грушевидные, круглые, аморфные, с вакуолями в области хроматина, с маленькой акросомальной областью (меньше 40% площади головки), вакуолизированной акросомой, несимметрично расположенной акросомой, двойные и множественные, с компактным строением хроматина в виде ядра.

Дефекты шейки и средней части: «склонённая» шейка (шейка и хвост образуют угол 90° к длинной оси головки), асимметричное прикрепление средней части к головке, утолщённая или неравномерная средняя часть, патологически тонкая средняя часть, а также любая комбинация данных признаков.

Дефекты хвоста: хвосты короткие, множественные, в виде шпильки, сломанные, наклонные (угол больше 90°), неравномерная толщина хвоста, тонкая средняя часть, закрученный конец, а также любая комбинация данных признаков.

Цитоплазматическая капля, если она есть, в норме не должна быть более $1/3$ головки сперматозоида. В последние годы было доказано, что наличие цитоплазматических остатков на сперматозоиде затрудняет фертилизацию. Остатки цитоплазмы, хорошо различимые при окрашивании, являются хорошим маркёром в патологиях, связанных с оксидативным стрессом. По-видимому, нарушение сперматогенеза приводит к удержанию цитоплазмы дифференцирующегося сперматозоида, в связи с чем возрастают перекисные повреждения плазмменных мембран и как результат – неспособность сперматозоида проникать через блестящую оболочку и осуществлять оплодотворение.

При морфологическом анализе считаются только полностью сформированные сперматозоиды (с хвостом), изменённые (с иглоподобной, точечной головкой и головками без хвоста, если их много) анализируются и считаются отдельно. Если в препарате видно большое количество (более 20%) сперматозоидов с иглоподобной головкой, это в спермограмме следует отметить особо. В нормальном эякуляте нормальные морфологически неизменённые сперматозоиды составляют 80-85%. Увеличение количества патологических форм сперматозоидов выше референтных значений называется *тератозооспермией*.

Наиболее частые морфологические изменения сперматозоидов:

-  отсутствие головки;
-  чрезмерно крупная головка;
-  удвоение головки;
-  патология шейки с наклонным расположением на ней головки;
-  отсутствие хвоста;
-  удвоение хвоста;
-  юная форма с цитоплазматической каплей в области шейки.

«Круглые клетки» в препаратах спермы

Клетки сперматогенеза. В препаратах спермы встречаются клетки сперматогенеза (2-4%) на разных стадиях созревания – это сперматогонии, сперматоциты I и II порядка и сперматиды. Они хорошо различимы в нативном препарате. Это клетки правильной круглой формы, разных размеров, с плотной гомогенной цитоплазмой, с одним или несколькими ядрами также плотной структуры и круглой формы. В спермограмме считаются отдельно.

Остаточные тельца (свободные цитоплазматические капли) образуются в процессе формирования сперматозоида или разрушения сперматид. Остаточных телец в нормальном эякуляте практически нет, их появление обычно сочетается с образованием клеток сперматогенеза.

Макрофаги – это большие клетки круглой формы с эксцентрично расположенным ядром. Цитоплазма вакуолизирована и может содержать лейкоциты, фрагменты ядер разрушенных клеток, бактерии. В сперме здорового мужчины макрофагов нет. Макрофаги, фагоцитирующие сперматозоиды, называются **спермиофагами**. Появление спермиофагов обусловлено длительным застоем спермы в эпидидимисе и выходом из него неполноценных или старых сперматозоидов.

Эритроциты в сперме здоровых мужчин не встречаются. Появление данных клеток в эякуляте носит название **гемоспермии**.

Эпителиальные клетки. В семенной жидкости можно обнаружить единичные клетки *многослойного плоского ороговевающего эпителия*, которые при эякуляции смываются с головки полового члена и крайней плоти. Поверхностные клетки *неороговевающего многослойного плоского эпителия*, выстилающие дистальный отдел ладьевидной ямки, также могут присоединиться к эякуляту. Клетки *цилиндрического и переходного эпителия* выстилают различные участки уретры и также могут отторгаться во время семяизвержения и выявляться в сперме.

Расчёт показателей дефектов сперматозоидов

Морфологически аномальные сперматозоиды часто имеют многочисленные дефекты. В предыдущие годы регистрировались преимущественно дефекты головки. В настоящее время протоколируется количество дефектов, имеющихся у каждого из патологических сперматозоидов. Затем рассчитывается индекс тератозооспермии (TZI) или множественный индекс аномалий (MAI). Они определяются как отношение полного числа дефектов к числу сперматозоидов с дефектами. Значения TZI могут находиться в диапазоне от 1 (каждый аномальный сперматозоид имеет только один дефект) до 3 (каждый аномальный сперматозоид имеет дефект головки, средней части и хвоста). Показано, что пациенты с индексом TZI, превышающим 1,6, имеют низкую способность к оплодотворению.

Оценка жизнеспособности сперматозоидов

Если при анализе подвижности сперматозоидов выявлено более 50% неподвижных, необходимо провести точную оценку мёртвых и живых сперматозоидов. Для этого используются два варианта суправитальной окраски сперматозоидов по Блюму.

1. Применяется только эозин (3 или 5% раствор эозина на дистиллированной воде, в некоторых руководствах предлагается использовать 1%). Живые сперматозоиды бесцветные (белые), мёртвые окрашиваются в оранжевый цвет.

2. Эозин-нигрозин (3% водный раствор эозина и 10% – нигрозина). При оценке теста живые сперматозоиды бесцветные, мёртвые окрашены в оранжево-красный цвет. При этом фон препарата остаётся тёмным, что облегчает его изучение.

Из 100 сперматозоидов рассчитывается процент живых и мёртвых. Нормальным считается эякулят, в котором не менее 75% живых сперматозоидов.

ТРАКТОВКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭЯКУЛЯТА

По данным литературы, нормы показателей количества сперматозоидов колеблются в очень широких пределах: от 15-20 до 40 млн в 1 мл. Для проведения ЭКО достаточно и 10 млн/мл, а для ICSI (эндоцитоплазматического введения сперматозоида в яйцеклетку) необходимы единичные неподвижные сперматозоиды. Нормы их подвижности достигают, по данным разных авторов, 70-80% [3].

В настоящее время наиболее корректными являются нормативы, предложенные ВОЗ после статистической обработки результатов деятельности нескольких десятков самых крупных мировых центров, занимающихся проблемами бесплодного брака. На практике используются следующие нормы показателей спермограммы (табл. 1 и 2).

Показатели нормы спермограммы

Параметр	Норма
Объем эякулята	2-6 мл
Консистенция	Вязкая
Срок разжижения	10-60 минут
Вязкость эякулята	До 20 мм
Цвет эякулята	Серовато-белый
Запах эякулята	Специфический
pH	7,2-7,8
Мутность	Мутная
Слизь	Нет
Количество сперматозоидов в 1 мл	20 млн и более
Общее количество сперматозоидов в эякуляте	Не менее 40 млн
Активноподвижные (А)	Более 25%
Малоподвижные с поступательным движением (В)	Менее 50%
Подвижность (А+В)	Более 50%
Отсутствие поступательного движения (С)	Нет
Неподвижные (D)	Менее 50%
Жизнеспособность сперматозоидов	Более 70%
Агглютинация сперматозоидов	Нет
Агрегация сперматозоидов	Нет
Морфологически нормальные	Более 30%
Патологические формы	Менее 50%
Клетки сперматогенеза	2-4%
Незрелые сперматозоиды	2%
Остаточные тельца	Немного
Лейкоциты в 1 мл	Менее 1 млн
Эритроциты	Нет
Макрофаги	Нет
Спермиофаги	Нет
Лецитиновые зёрна	Немного
Амилоидные тельца	Нет

Таблица 2

Характерные изменения спермограммы и общепринятая терминология для её обозначения

Термин	Описание
Нормозооспермия	Нормальный эякулят, спермограмма в пределах референтных величин
Олигозооспермия	Концентрация сперматозоидов ниже референтной величины
Астенозооспермия	Количество подвижных сперматозоидов ниже референтной величины
Тератозооспермия	Морфологические изменения превышают референтную величину
Олигоастенотератозооспермия	Комбинация трёх вышеназванных нарушений спермограммы
Глобозооспермия	Отсутствие акросомы
Азооспермия	Сперматозоиды отсутствуют в эякуляте
Аспермия	Эякулят отсутствует

Количественные и качественные показатели эякулята по степеням представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Концентрация и общее количество сперматозоидов в эякуляте

Нормозооспермия	Олигозооспермия		
	I ст.	II ст.	III ст.
Концентрация сперматозоидов, млн/мл			
20 и более	10-19	5-9	Менее 5
Общее количество сперматозоидов, млн			
40 и более	20-39	10-19	Менее 10

Таблица 4

Качественные параметры сперматозоидов в эякуляте

Показатели	Нормозооспермия	Астенозооспермия		
		I ст.	II ст.	III ст.
Подвижность, %	40 и более	20-39	10-19	Менее 10
Жизнеспособность, %	90 и более	70-90	50-70	Менее 50

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стремительное развитие исследований в области андрологии стимулирует изучение процесса сперматогенеза, оценка которого в клинической практике часто основывается на результатах спермограммы пациента. Основное клиническое предназначение этой оценки состоит в определении качества сперматозоидов с целью выявления их потенциальной способности к оплодотворению яйцеклетки и нахождения возможных причин бесплодия для последующей выработки метода его лечения.

На сегодняшний день в клинической практике два основных параметра являются общепринятыми критериями оценки сперматогенеза: процент подвижных сперматозоидов с поступательным движением и доминирование морфологически нормальных сперматозоидов. Оба эти параметра анализируются врачом визуально под микроскопом и оцениваются субъективно, что может привести к искажению результатов и некорректному диагностическому заключению.

Даже при очень тщательном выполнении исследования эякулята высококвалифицированным специалистом разброс количественных и качественных показателей составляет не менее 10% и резко увеличивается в случае наложения дефектов (при подготовке, получении материала, проведении исследования). Поэтому для определения и коррекции ошибок необходим как внутренний контроль качества, проводимый в каждой лаборатории, так и внешний.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гончаров Н.П., Добрачёва А.Д., Корякин М.В.* Атлас морфологических форм сперматозоидов. М.: Мед. информ. агентство, 2006. 96 с.
2. *Долгов В.В., Луговская С.А., Фанченко Н.Д.* и др. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. М.: Триада, 2006. 145 с.
3. *Каган С.А.* Стерильность у мужчин. Л.: Медицина, 1974. 224 с.
4. *Карпищенко А.И.* Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник. СПб.: Интермедика, 2002. 600 с.
5. *Лопаткин Н.А.* Руководство по клинической урологии. М., 1986. 338 с.

ТЕСТОВЫЕ ВОПРОСЫ

1. Эякулят – это продукт жизнедеятельности:
 - а) яичек
 - б) секрета простаты
 - в) секрета семенных пузырьков
 - г) пара- и бульбоуретральных желез

2. Обязательным при макроскопическом исследовании эякулята является определение следующих параметров:
 - а) объем
 - б) вязкость
 - в) подвижность сперматозоидов
 - г) рН

3. Микроскопическое исследование эякулята включает определение:
 - а) концентрации сперматозоидов
 - б) подвижности сперматозоидов
 - в) жизнеспособности сперматозоидов
 - г) клеточного состава эякулята

4. К неклеточным элементам в эякуляте относят:
 - а) лейкоциты
 - б) лецитиновые зерна
 - в) амилоидные тельца
 - г) кристаллы Беттхера

ОТВЕТЫ

1 – а, б, в, г; 2 – а, б, г; 3 – а, б, в, г; 4 – б, в, г.

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
Московской области
Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского
(129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2)

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЯКУЛЯТА

Учебное пособие

Редактор: Л.Ю. Заранкина

Корректор: Ю.Н. Мачульская

Оригинал-макет: Л.Н. Ситникова

ISBN 978-5-98511-227-6



Подписано в печать 19.02.2014 г. Тираж 200 экз. Заказ №02/14

Отпечатано в МОНИКИ