

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования "Красноярский государственный медицинский  
университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства  
здравоохранения Российской Федерации

Кафедра урологии, андрологии и сексологии ИПО

Заведующий кафедрой: Фирсов М.А.

## РЕФЕРАТ

На тему:

«Диагностика мужского бесплодия»

Выполнил: ординатор 1  
года по специальности  
урология Грищенко А.С.

Красноярск 2023 г.

## Введение

В современном мире наряду с увеличением продолжительности и качества жизни растет число бесплодных пар. По данным Европейской ассоциации урологов (European Association of Urology, EAU), у 15 % пар, стремящихся зачать ребенка, беременность не наступает в течение 1 года, что побуждает их обратиться за медицинской помощью. Каждая 8-я пара сталкивается с трудностями при попытке зачать первого ребенка, каждая 6-я пара – при попытке зачать последующего.

Бесплодие – актуальная проблема современности. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2010 г. около 15% сексуально активных супружеских пар обращаются за помощью из-за невозможности забеременеть на протяжении 12 месяцев, что составляет примерно 48,5 млн пар во всем мире. Из них 5% пар после лечения так и не имеют возможность иметь биологических детей. Таким образом, каждая пятая пара в западных странах и четвертая в мире страдает бесплодием. В большинстве стран мира данная проблема имеет тенденцию к росту.

В настоящее время в России показатель бесплодия превышает 17%. По данным Росстата в Российской Федерации, начиная с 2015 г., отмечено снижение уровня рождаемости. В 2017-2018 годы число умерших россиян превысило число родившихся. Уровень рождаемости в 2018 году составил 10,7 рождений на 1000 человек населения, занимая 184 место в мире, в то время как уровень смертности был равен 13,4 случаев на 1000 человек населения, что соответствует 8 месту в мире.

Одной из причин снижения рождаемости в России может быть увеличение доли бесплодных пар. Согласно данным отечественных исследователей доказана роль мужского фактора бесплодия, частота которого в России может достигать 17-30-50%. Нередко нарушение мужской фертильности носят приобретенный генез, связанный с образом жизни, несвоевременной коррекцией заболеваний мочеполового тракта, неблагоприятной экологической ситуацией и пр. Важным моментом является тенденция к снижению репродуктивного потенциала мужчины за последние десятилетия, которая находит отражение в литературных мировых источниках.

Помимо ненаступления беременности, важная составляющая комплексной проблемы бесплодия – невынашивание беременности. Согласно данным регистра Российской ассоциации репродукции человека за 2016 г., в Российской Федерации заканчиваются родами на сроке 22 нед и более только

76,3 % беременностей, наступивших в результате применения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ): экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (intracytoplasmic sperm injection, ICSI). А частота родов в расчете на пункцию фолликулов составляет для ЭКО и ICSI соответственно 22,0 и 18,6 %.

Таким образом, бесплодный брак представляет собой не только медико-биологическую, но и важную социальную проблему. Оптимизация лечебно-диагностических и профилактических мероприятий в секторе репродуктивного здоровья является одной из основных задач, направленных на повышение рождаемости в мире.

В предлагаемом учебном пособии представлены современные данные о классификации мужского бесплодия, этиологических факторах и диагностических инструментах, рекомендованных к использованию ВОЗ.

Основной задачей представленной в пособии информации является оптимизация лечебно-диагностических манипуляций в практике врачей-урологов, гинекологов, что позволит повысить эффективность программ по преодолению бесплодия.

### Общие сведения о бесплодии. Терминология: фертильность, плодовитость, первичное и вторичное бесплодие.

У репродуктивно здоровой пары кумулятивная вероятность наступления беременности в первые 3 месяца регулярной половой жизни без предохранения составляет около 30%, в течении полугода – 75%, 1 года – примерно 90%, далее шансы на самостоятельное зачатие в последующий год снижаются до 5 %.

ВОЗ определяет бесплодие как невозможность зачать ребенка в течении 1 года и более, при наличии регулярной половой жизни, без использования средств контрацепции. От 40% до 50% случаев бесплодия обусловлены женскими факторами. Они включают в себя: овуляторную недостаточность, повреждение фаллопиевых труб, эндометриоз, эндокринную патологию, инфекционно-воспалительные заболевания органов малого таза, субфертильность неясного генеза и др. Примерно в половине случаев бесплодный брак связан с нарушениями фертильности мужчины. Предполагается, что в мире до 25% пар испытывают трудности с деторождением, включая потери беременности.

По данным систематического анализа распространенность первичного бесплодия составляет 1,9%, вторичного 10,5%. Репродуктивный статус

мужчины и женщины определяется возможностью не только зачатия, но и рождения здорового ребенка.

**Фертильность** – способность вызвать беременность.

**Плодовитость** – способность женщины, мужчины, супружеской пары к зачатию и рождению живых детей.

**Первичное бесплодие** – состояние, при котором от мужчины не было ни одной беременности, несмотря на регулярную половую жизнь в течении года без применения контрацептивных средств.

**Вторичное бесплодие** – состояние, при котором в прошлом удавалось достичь беременности, однако в течении года регулярной половой жизни без контрацепции зачатие более не происходит. Термин используется в случае, когда в анамнезе у пары были зафиксированы беременности, заканчивающиеся живорождением, невынашиванием на разных сроках гестации, прерыванием по медицинским или иным причинам.

В процессе биологического старения происходит инволюция репродуктивной функции женщины: в 35 лет потенциал к зачатию составляет 50%, в 38 – 25%, а после 40 лет менее 5% в сравнении с 25-летними. Отсутствие беременности у женщины старше 35 лет в течение полугода безуспешных попыток является показанием к детальному обследованию.

С возрастом фертильность снижается не только у женщин, но и у мужчин. Ряд исследований показали, что после 40 лет имеется тенденция к снижению объема спермы, общего количества и прогрессивной подвижности сперматозоидов, уменьшается число морфологически нормальных форм. Возникают риски фрагментации ДНК гамет. Кроме этого, повышается частота мутаций *de nova*, снижается эффективность гомологичной рекомбинации, что приводит к нестабильности генома и рискам анеуплоидий генома сперматозоидов. Это может стать причиной спонтанных выкидышей или рождения детей с пороками развития, включая риски эпилепсии, шизофрении и аутизма.

Вышеперечисленное диктует необходимость учитывать возраст и репродуктивный статус партнеров для определения тактики лечения бесплодной пары. Специалисту важно дать прогноз в каждом конкретном случае, как при планировании самостоятельной беременности, так и с использованием методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), опираясь на статус единой репродуктивной единицы.

## Фундаментальные данные о сперматогенезе

### История спермиологии

Основоположником спермиологии является нидерландский ученый, изобретатель первого микроскопа – Антони ван Левенгук. В 1677 году он впервые в истории увидел и описал сперматозоиды. Несмотря на отсутствие университетского образования, Левенгук являлся одним из самых ценных корреспондентов Лондонского королевского общества. Антони Левенгук, будучи ортодоксальным протестантом кальвинистом, неохотно занимался изучением спермы, так как считал это «грешной темой». Увидев в семенной жидкости маленькие неподвижные глобулы, он не проявил изначально должного интереса.

Спустя 3 года студент Лейденского университета Йохан Хэм, рассказал Левенгуку, что у анималькулей («маленькие животные», «живчики» - лат.) есть хвосты и живут они 24 часа. Антони вновь принялся изучать семенную жидкость и в 1677 году детально описал сперматозоиды. Автор отметил, что размеры сперматозоидов меньше частиц, придающих красный цвет крови (так он называл ранее описанные им эритроциты), концентрация их достигает более тысячи, а движение хвостов, напоминающие змей или угрей в воде, придает подвижность. Впоследствии Левенгук изучал сперму собак, кроликов, рыб. В 1678 г. его работа была опубликована в журнале «Философские труды», но не явилась первой публикацией, в которой описали сперматозоиды. Первая печатная работа о гаметях была опубликована в научном журнале «Journal des savans». Авторами были физик-математик Христиан Гюйгенс и Николас Хартсоекер – студент Лейденского университета, занимавшийся оптикой и микроскопией. В своей работе ученые не упомянули имя Антони ван Левенгука.

Левенгук писал, что «семенные зверьки» участвуют в зачатии, а именно в них содержится зародыш, который при попадании в питательную среду матки, начинает развиваться. В конце 1700-х годов роль сперматозоидов в оплодотворении была доказана естествоиспытателем Ладзаро Спалланцани, который показал, что при удалении сперматозоидов из семенной жидкости жабы оплодотворение не происходит.

Термин «сперматозоид» впервые ввел академик Петербургской Академии наук Карл Эрнст Бэр в начале XIX века.

В 1876 году О. Гертвиг подробно продемонстрировал процесс слияния двух ядер при оплодотворении яйцеклетки сперматозоидом. Объектом

исследования стал морской еж (*Toxopneustes lividus*), яйца которого доступны в большом количестве и достаточно прозрачны для наблюдения процесса слияния гамет. Гертвиг отметил, что каждое яйцо оплодотворяется только одним сперматозоидом, и все последующие клетки зародыша являются родственными по отношению к первым двум. Сингамия морского ежа до сих пор является наиболее изученным процессом оплодотворения среди живых организмов. Впоследствии Г. Фоль дополнил наблюдения Гертвига, более детально изучив и описав процесс оплодотворения. Таким образом, история изучения сперматогенеза насчитывает более 300 лет. Несмотря на технологический прорыв, оценка количественных и качественных характеристик сперматозоидов с использованием микроскопа, остается базисом спермиологии.

### **Этапы сперматогенеза**

Сперматогенез происходит в просвете семенных канальцев, выстланных сперматогенным эпителием при поддержке клеток Сертоли (суспендоцитов) и Лейдига, с обязательным участием интратестикулярного тестостерона. Во избежание иммунной аутоагрессии яичко обеспечено системой гематотестикулярного барьера.

**Гаметогенез** – сложный многоэтапный процесс, находящийся под контролем генетической, эндокринной, иммунной систем и кодируется более чем 3000 генов. Период последовательного преобразования первичных половых клеток в зрелые сперматозоиды в среднем составляет 65-80 дней и включает 4 этапа:

1. Митотическая пролиферация и дифференцировка диплоидных половых клеток
2. Мейотическое деление тетраплоидных половых клеток до гаплоидных.
3. Спермиогенез в ходе которого круглые сперматиды превращаются в удлинённые, а затем в зрелые сперматозоиды.
4. Спермиация – это процесс высвобождения сперматозоидов в просвет канальца.

### **Митотическая пролиферация и дифференцировка диплоидных половых клеток**

У базальной мембраны семенного канальца расположены сперматогонии. Морфологически сперматогонии делятся на два типа: А и В. Сперматогонии типа А разделяют по степени конденсации хроматина в ядре на темные (конденсированный хроматин) и светлые (диффузный хроматин.)

Темные сперматогонии типа А составляют резервный пул клеток, не проявляют пролиферативной активности и подвергаются митотическим изменениям только при резком снижении плотности сперматогоний в яичках, которое возможно после радиационного облучения, химиотерапии, крипторхизме. Светлые сперматогонии типа А непрерывно делятся путем митоза и образуют равное количество дочерних клеток типа А и В. В результате редукционного деления светлой сперматогонии типа А образуются либо две сперматогонии типа В, либо одна сперматогония типа В и одна светлая сперматогония типа А. Сперматогонии типа В имеют светлое округлое ядро с хорошо конденсированным хроматином. В результате нескольких митотических делений последние дифференцируются в сперматоциты I порядка, которые соединены между собой цитоплазматическими мостиками, образуя синцитий.

### **Мейотическое деление тетраплоидных половых клеток до гаплоидных**

Мейоз важный этап гаметогенеза, в результате которого происходит рекомбинация генетического материала, уменьшения числа хромосом и развитие сперматид. После удвоения количества хромосом и миграции сперматоцитов I порядка в адлюминальный слой канальцевого эпителия, они проходят первое мейотическое деление, в результате которого образуются два сперматоцита II порядка. После второго мейоза сперматоциты дифференцируются в четыре округлые сперматиды с гаплоидным набором хромосом: 22 аутосомы и 1 половая хромосома (X/Y)

### **Спермиогенез**

Процесс преобразования округлых сперматид в удлиненные, а затем в морфологически зрелые сперматозоиды. Округлые и пролонгированные сперматиды по набору генома не отличаются от сперматозоидов.

В процессе последовательной трансформации круглых сперматид в вытянутые происходит внутриклеточная перестройка органелл. В результате интенсивного развития аппарата Гольджи до формирования гранул, образуется акросома, содержащая протеолитические ферменты. Затем удлиняется ядро, конденсируется хроматин, формируется аксонема, митохондрии мигрируют в область слияния головки и хвоста, формируя шейку сперматозоида. Происходит замена белков гистонов на протамины, что способствует компактизации хроматина.

### **Спермиация**

Процесс выхода зрелых сперматозоидов в просвет извитых канальцев. По мере прохождения сперматозоида формируется цитоплазматическая

капля (резидуальное тельце). Остатки цитоплазмы фагоцитируются клетками Сертоли. На этой стадии сперматогенеза разрываются цитоплазматические мостики. Извитые каналцы сливаются в прямые с формированием сети яичка. Отсюда морфологически зрелые гаметы свободно передвигаются по направлению к придатку, где происходит окончательное дозревание. Далее сперматозоиды поступают в семявыносящие пути.

Продукт семяизвержения – на 5-10% представлен сперматозоидами и эпидидимальным компонентом и на 90-95% - семенной плазмой. При этом продукт семенных пузырьков составляет до 60-80% спермоплазмы, секрет предстательной железы – 10-30% и незначительный объем – 2-5% секретируют парауретральные и бульбоуретральные (Куперовы) железы. Добавочные половые железы являются важнейшими «игроками», поддерживающими капациацию, жизнеспособность и функциональность сперматозоидов на этапе попадания спермы в половые пути женщины, вплоть до оплодотворения.

Таким образом, сперматогенез – по-своему уникальный и неповторимый по сложности процесс, позволяющий воспроизводить в организме мужчины живую подвижную клетку – носитель генетической информации. Именно многоступенчатость и филигранность вышеописанных механизмов несет в себе потенциальную уязвимость для разного рода неблагоприятных факторов.

### **Регуляция сперматогенеза**

Репродуктивная и эндокринная функции яичек контролируются центральной нервной системой. Процесс регуляции является результатом сложного взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем организма. Ключевая роль принадлежит гонадотропин релизинг гормону (ГнРГ) - люлеберин. Он секретируется в импульсном режиме нейросекреторными клетками преоптической зоны гипоталамуса. Выброс гормона происходит каждые 90-120 минут. Поступая в переднюю долю гипофиза (аденогипофиз), люлеберин стимулирует выработку базальными клетками фолликулостимулирующего (ФСГ) и гонадотропными клетками лютеинизирующего гормонов (ЛГ). ФСГ стимулирует развитие половых клеток, ЛГ - стероидных гормонов яичками. Секреция ЛГ совпадает с пульсацией ГнРГ, секреция ФСГ имеет больший интервал. Период полувыведения ЛГ составляет 50 минут, ФСГ - 180-200 минут.

ЛГ с током крови попадает интерстиций яичка, где поступает в клетки Лейдига. Под его действием происходит образование тестостерона из

холестерина. Андроген частично попадает в системный кровоток, другая фракция связывается с андрогенсвязывающим белком (АСБ), Последний в канальцевом отделе яичка стимулирует сперматогенез. Мишенью для тестостерона являются клетки Сертоли. В отсутствие тестостерона сперматогенез нарушается на стадии мейоза. ФСГ связывается с клетками Сертоли, следствием чего является продукция активных веществ:

- АСБ.
- Цитокины интерлейкин1 – активирует сперматогенез, интерлейкинб - ингибирует сперматогенез.
- Активин А - стимулирует синтез ФСГ.
- Ингибин В-угнетает синтез ФСГ.
- Трансферрин - стимулирует пролиферацию сперматоцитов.

ФСГ стимулирует синтез рецепторов андрогенов клетками Сертоли, тестостерон активирует рецепторы к ФСГ. Андрогены оказывают влияние на секреторную активность гипоталамуса, выработку ЛГ и ФСГ по типу отрицательной обратной связи. По подобному механизму функция гипоталамо-гипофизарной системы находится в зависимости от уровней ингибина В и активина А. Нейромедиаторная система регуляции репродуктивной функции представлена дофамином, норадреналином, серотонином, эндорфинами, альфа-адренергической системой.

### **Спермиологические исследования**

Шестое издание руководства ВОЗ по исследованию эякулята определяет спермограмму, как стандартный диагностический тест для оценки качества эякулята и фертильного потенциала мужчины, являющийся обязательным на начальном этапе исключения мужского фактора бесплодия. Тем не менее он не является 100% индикатором плодовитости. Несмотря на то, что каждый параметр спермограммы имеет важную прогностическую оценку, те или иные отклонения от нормы не всегда свидетельствуют о невозможности зачатия ребёнка, и наоборот-нормативные значения не являются абсолютным гарантом фертильности. В ряде случаев женщина с высоким репродуктивным потенциалом может компенсировать субфертильность партнёра и, соответственно, наоборот. Единственным показателем плодовитости можно считать рождение здорового ребенка.

Причины, приводящие к патологии спермы, могут быть обусловлены как внутренними, так и внешними факторами: генетические и хромосомные аномалии, варикоцеле, инфекционно-воспалительные заболевания полового

тракта, состояния после лечения онкологических заболеваний, оперативные пособия в анамнезе, метаболические нарушения, сахарный диабет, гормональные нарушения, расстройства эякуляции, прием гаметотоксичных медикаментов, вредные привычки (табакокурение, алкоголь, употребление наркотиков), профессиональные вредности (высокие температуры, контакт с тяжелыми металлами, ионизирующее излучение), экология, питание и пр. Примерно в 30% случаев не удаётся выявить причины мужской инфертильности. Следует принимать во внимание, что такие артефакты, как неправильный сбор эякулята (потеря части фракции) и нарушение мужчиной предписаний при подготовке к сдаче спермы, могут негативно отразиться на результатах спермограммы и изменить реальную картину фертильного потенциала. Это диктует необходимость предварительного информирования пациента о тщательном соблюдении общепринятых правил при прохождении данного исследования.

## **1. Подготовка мужчины к исследованию**

При направлении пациента на спермограмму врач обязан подробно объяснить, какие условия подготовки должны быть выполнены для получения достоверного результата этого исследования. Необходимо объяснить пациенту, что четкое соблюдение условий подготовки имеет очень большое значение для объективного результата.

- Эякулят должен быть получен после воздержания от семяизвержений в течение 2,5-4,5 сут (в крайнем случае от 1,5 до 6,5 сут), но не более 7 дней. Пациент должен обеспечить регулярные семяизвержения в течение 1-2 мес перед исследованием эякулята для предотвращения явлений застоя. За 2,5-4,5 суток нужно добиться семяизвержения любым доступным образом и больше до сдачи анализа семяизвержений не иметь. Период воздержания при нескольких исследованиях рекомендуют сохранять одинаковым, чтобы можно было сопоставить результаты исследования.
  - *Длительные абстиненции в течение нескольких месяцев перед обследованием могут привести к нарушению эффективного процесса сперматогенеза, появлению старых, дегенеративных форм, снижению качественных параметров сперматозоидов.*

- *Воздержание от предыдущего семяизвержения менее 1 сут резко снижает общее количество, концентрацию сперматозоидов в эякуляте и их качественные параметры (подвижность, жизнеспособность, скоростные параметры). При воздержании более 6-7 сут часть сперматозоидов (наиболее старых) сбрасывается в семенные пузырьки и разлагается. Точно оценить в этом случае сперматогенную функцию паренхимы яичек оказывается невозможным.*
- Следует запретить обследуемому употреблять алкоголь в любых количествах в течение 6-7, а лучше 10 сут перед сдачей эякулята на анализ. Также следует постараться исключить воздействие токсичных факторов в течение 2,5 мес перед исследованием эякулята. Хронические интоксикации (алкогольная, табачная, наркотическая, производственная, бытовая, лекарственная) закономерно приводят к снижению качественных, а иногда и количественных показателей эякулята. Употребление алкоголя, наркотических препаратов, лекарственных средств и других токсичных веществ в течение 5-10 сут перед сдачей анализа приводит к накоплению токсинов в организме и может снизить качественные параметры сперматозоидов.
- При воспалительных заболеваниях мочеиспускательного канала и/или простато-везикулярного комплекса перед исследованием эякулята рекомендуют провести санацию и выждать не менее 2 нед (для ликвидации медикаментозной интоксикации). Интоксикации на фоне острых и хронических заболеваний могут привести к снижению качественных и количественных показателей эякулята.
- Алиментарные факторы, такие как гипотрофия, авитаминоз, могут привести к нарушению сперматогенеза и недостаточной выработке полноценных сперматозоидов.
- Необходимо отказаться от исследования эякулята, если в течение 7-10 сут перед анализом были отмечены простудные или другие острые заболевания, протекавшие с лихорадкой. Гипертермия (бытовая, производственная, при лихорадке) нарушает сперматогенез, нормально

протекающий при температуре на 2-3 °С ниже температуры тела. При гипертермии могут снижаться как количественные, так и качественные показатели спермограммы.

- Накануне сдачи эякулята на анализ исключают тяжелые физические нагрузки, конфликтные ситуации. Ночью перед сдачей анализа рекомендуют обеспечить полноценный отдых. Физическая усталость (работа в ночную смену, тяжелые физические нагрузки, бессонная ночь накануне сдачи анализа эякулята) может привести как к нарушениям процесса получения эякулята, так и снижению качественных параметров сперматозоидов.
- Психоэмоциональный дискомфорт (подавленное, раздраженное состояние, боязнь или нежелание мастурбировать, раздражающее, отвлекающее влияние окружающих и обстановки сбора эякулята) может привести к нарушению процесса получения эякулята.
- Возможность умышленного нарушения условий подготовки для получения негативных результатов сперматологического исследования (при судебных исках об установлении отцовства и т.д.) обязательно должна учитываться при трактовке полученных результатов.

## **2. Получение эякулята и возможные погрешности при этой процедуре**

- Перед получением эякулята следует помочиться (смыть мочой содержимое мочеиспускательного канала). Перед мастурбацией необходимо обмыть половые органы с мылом и после этого обязательно тщательно смыть мыльный раствор проточной водой, вымыть руки с мылом (особенно тщательно, если планируется бактериологическое исследование эякулята).

### ***Токсическое поражение эякулята возможно вследствие:***

- попадания в эякулят слюны, кремов, вазелина, используемых при мастурбации;
- попадания влагалищного содержимого в эякулят при прерванном половом акте;

- умышленного введения пациентом слюны или химических веществ в собранный эякулят для искусственного создания некроспермии и астенозооспермии.

***Получение на исследование только части эякулята может быть вызвано тем, что:***

- часть эякулята не попала в баночку (первые капли, реже средняя или конечная порция);
- умышленно взята только часть эякулята для получения негативного результата исследования;
- эякуляция проведена с неполным опорожнением простаты, семенных пузырьков, придаточных половых желез, неполным выбросом сперматозоидов из семявыбрасывающего протока;
- при длительной мастурбации (затруднении в достижении эякуляции), неоднократных неудачных попытках вызвать эякуляцию через короткий промежуток времени (10-15 мин) происходит сброс части семенной жидкости (сока простаты, содержимого семенных пузырьков) до начала эякуляции.

Посуда для получения и хранения эякулята должна быть чистой, без капель воды, следов дезинфицирующих и моющих веществ, поскольку примеси могут повредить эякулят.

**Сбор спермы в домашних условиях** возможен в исключительных случаях, таких как доказанная неспособность получить эякулят путем мастурбации в клинике.

1. Мужчине следует дать четкие письменные и устные инструкции по сбору и транспортировке спермы.
2. Важно, чтобы весь эякулят был собран в контейнер (пациент должен сообщить о любых потерях какой-либо фракции спермы).
3. Мужчине необходимо выдать предварительно взвешенный контейнер, указать ФИО и номер медицинской карты.
4. Пациент должен записать время получения образца и доставить его в лабораторию в течение 1 ч после эякуляции.
5. Во время транспортировки в лабораторию образец следует хранить при температуре от 20 до 37°C.
6. В отчете следует отметить, что образец был собран в домашних условиях или в другом месте вне лаборатории.

## **Сбор эякулята с помощью презерватива**

Образец может быть собран в презерватив во время сексуального контакта только в исключительных случаях, таких как доказанная невозможность сбора спермы посредством мастурбации.

*Только специальные нетоксичные презервативы, разработанные для сбора эякулята, могут быть использованы; такие презервативы коммерчески доступны.*

1. Пациенту следует записать время эякуляции и доставить образец в лабораторию в течение 1 ч после сбора.
2. В отчете следует отметить, что образец был собран с помощью специального презерватива по время полового контакта в домашних условиях или в другом месте вне лаборатории.
3. Обычные латексные презервативы нельзя использовать для сбора образца, так как они содержат реагенты, которые влияют на подвижность и жизнеспособность сперматозоидов.

Прерванный половой акт является ненадежным способом сбора эякулята, так как первая порция, которая содержит максимальное число сперматозоидов, может быть утеряна. Более того, возможна клеточная и бактериологическая контаминация образца, а низкий рН влагалища может негативно отразиться на подвижности сперматозоидов.

Существует высокий риск использования «дефектных» показателей эякулята при однократном его исследовании. Для первичной оценки следует провести два исследования с интервалом не менее 7 сут и не более 3 нед. При выявлении не обоснованных другими данными патологических изменений в спермограмме необходимо убедиться в достоверности полученных результатов повторным исследованием. Достоверными можно считать наиболее высокие количественные и качественные показатели при отсутствии явных дефектов подготовки, получения и проведения исследования (даже если часть показателей берется из одного исследования эякулята, а остальные - из другого).

## **Референтные значения эякулята**

Показатель	Значение
Объем	2-6 мл
Разжижение	Должно произойти в течение 60 мин
pH	7,2-8,0
Концентрация сперматозоидов	20×10 <sup>6</sup> /мл и более
Общее количество сперматозоидов в эякуляте	40×10 <sup>6</sup> и более
Подвижность	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 50% и более подвижных (категория a + b) или</li> <li>▪ 25% и более с поступательным движением (категория a) в течение 60 мин после эякуляции</li> </ul>
Морфология	>30% нормальных сперматозоидов
Жизнеспособность	<p>&gt;75% живых сперматозоидов, т.е. сперматозоидов, которые не окрасились в тесте с суправитальной окраской;</p> <p>&gt;30% сперматозоидов сохраняют жизнеспособность в течение 24 ч</p>
Агглютинация	Не выявляется
Лейкоциты	<1×10 <sup>6</sup> /мл

### 3. Макроскопическое исследование спермы

*Часть параметров при макроскопической оценке эякулята (цвет, запах, мутность, консистенция) имеют сугубо ориентировочное значение и не используются для клинического толкования результатов лабораторного исследования эякулята.*

#### 3.1 Разжижение

Сперма, полученная при эякуляции, густая и вязкая. Первоначальная коагуляция спермы в момент эякуляции, по-видимому, препятствует потере сперматозоидов во влагалище, а последующее ее разжижение обеспечивает их продвижение через шейку матки. Разжижение эякулята при комнатной температуре должно наступить в течение 60 мин, обычно наступает через 10-

30 мин. Однако в некоторых случаях разжижения эякулята не происходит за 60 мин. Если эякулят длительное время остается вязким, полувязким или вообще не разжижается, можно предположить воспаление простаты. При этом отмечается нарушение образования слизи и выделения муколитических ферментов. Вязкая консистенция спермы препятствует движению сперматозоидов, которые или не двигаются, или быстро теряют подвижность.

*Осторожное непрерывное перемешивание во время разжижения эякулята уменьшает ошибки при оценке количества сперматозоидов. Образец следует перемешивать в том же контейнере, в котором он был получен (трясти нельзя). Для равномерного осторожного перемешивания спермы можно использовать миксер для перемешивания крови. Для этого сперму необходимо перелить в пробирку, закрыть пробкой и поместить в миксер. Если разжижения эякулята не наступило, проводят дополнительную обработку образца перед анализом: добавляют ферменты (например, трипсин до конечной концентрации 1%). Иногда разжижения добиваются добавлением к сперме аналогичного объема питательной среды и многократным перемешиванием, повторным пипетированием (взятие эякулята в пипетку и сброс). Однако разбавление спермы может повлиять на показатели семенной плазмы, подвижность и морфологию сперматозоидов.*

### 3.2 Вязкость

Вязкость определяется через 1 ч после получения эякулята (после разжижения). Для того чтобы определить вязкость разжиженного эякулята, нужно окунуть в него стеклянную палочку, а затем поднять ее и измерить длину образующейся нити. В норме ее длина не должна превышать 2 см. В эякуляте с повышенной вязкостью образуется нить длиной более 2 см.

Можно определить вязкость эякулята с помощью пипетки с широким отверстием. Сперму следует набрать в пипетку и измерить длину нити при ее пассивном вытекании. В норме эякулят, вытекая из пипетки, образует маленькие отдельные капли.

**Вязкая консистенция разжиженного эякулята препятствует движению сперматозоидов**, при этом сперматозоиды или вообще не двигаются, или быстро теряют подвижность. Если в образце полученной спермы присутствуют тяжи слизи, вязкость оценивают в свободных от слизи участках. При повышенной вязкости для дальнейших исследований применяют процедуры разжижения. Повышенная вязкость наблюдается

достаточно часто (по некоторым данным, у 30-50% обследуемых) и может быть одним из факторов, снижающих подвижность сперматозоидов и препятствующих оплодотворяющей способности спермы. Нормальная вязкость разжиженного эякулята не исключает патологии.

### 3.3 Объем

В норме у здорового пациента после полового воздержания в течение 4-7 сут объем эякулята колеблется от 2 до 6 мл (нормоспермия).

Объем полученного эякулята измеряют сразу после разжижения в доставленном контейнере, если он градуирован. Наиболее удобно засасывание полученного эякулята в одноразовый 5-10 мл шприц с пластиковым поршнем. Можно взвесить контейнер до и после получения эякулята (1 г соответствует 1 мл).

- Объем эякулята меньше 2 мл называют олигоспермией (гипоспермией),
- Полное отсутствие эякулята - аспермией.

**Олигоспермия и аспермия наблюдаются при:**

1. окклюзии семявыносящих протоков;
2. ретроградной эякуляции;
3. хроническом воспалении предстательной железы и/или семявыносящих протоков;
4. дефиците гонадотропных гормонов;
5. врожденном отсутствии предстательной железы или семенных пузырьков;
6. снижение секреции в предстательной железе и семенных пузырьках;

**Снижение объема** эякулята характерно для азооспермии (отсутствие сперматозоидов в эякуляте, которое наблюдается при атрофии яичек или облитерации обоих семявыносящих протоков).

**Увеличение объема** эякулята более 6 мл называется полиспермией (гиперспермией). Причина и клиническое значение этого явления неизвестны. Полиспермия не влияет на фертильность. Однако фертильность снижается, а иногда и отсутствует при сочетании полиспермии и олигозооспермии.

### 3.4 Запах

Эякулят имеет характерный запах, который сравнивают с запахом цветов каштана. Этот запах сперма приобретает при присоединении секрета

предстательной железы. При закупорке выводных протоков предстательной железы специфический запах спермы снижается. При атрофии простаты и после простатэктомии сперма теряет этот запах.

Гнилостный запах сперма приобретает при гнойно-воспалительных процессах в простате, семенных пузырьках и зависит от продуктов жизнедеятельности микрофлоры, вызвавшей воспалительный процесс. Такой запах может появиться при длительном хранении спермы за счет микрофлоры.

### 3.5 Цвет

Описание цвета проводят сразу после разжижения или через 1 ч после эякуляции. **Нормальный эякулят мутный, молочно-белый или серовато-желтый.** Степень мутности зависит от количества сперматозоидов: если количество их снижено, эякулят более прозрачный. При длительном воздержании эякулят становится более прозрачным.

- Если в эякуляте присутствуют эритроциты, образец приобретает розовый, красный или красновато-коричневый оттенок (гемоспермия).
- Желтоватый и желтый оттенок эякулят приобретает при желтухе, приеме некоторых витаминов, рибофлавина и длительном половом воздержании.
- При большом содержании лейкоцитов сперма окрашивается в желтовато-зеленый цвет (пиоспермия).

## 4. Микроскопическое исследование спермы

Микроскопическое исследование эякулята проводят после полного разжижения материала. Оно включает:

1. изучение в нативном препарате подвижности сперматозоидов (кинезиограмма), наличия агглютинации или агрегации;
2. подсчет количества сперматозоидов, лейкоцитов и клеток сперматогенеза в камере Горяева;
3. дифференциальную диагностику живых и мертвых сперматозоидов;
4. изучение морфологии сперматозоидов, клеток сперматогенеза, лейкоцитов и эпителия в окрашенных препаратах;
5. обнаружение в этих препаратах простейших;
6. обнаружение в препаратах, окрашенных по Граму, грамотрицательных диплококков (Gn).

Согласно рекомендациям ВОЗ, микроскопическое исследование эякулята следует проводить в два этапа.

**На первом этапе** оценивают концентрацию, подвижность и агглютинацию сперматозоидов, а также наличие других клеточных элементов. Исследование проводят на неокрашенных мазках простой световой микроскопией или с помощью фазово-контрастного микроскопа.

**На втором этапе** исследование проводят на окрашенных препаратах, оценивают жизнеспособность сперматозоидов, определяют их концентрацию, проводят морфологическую классификацию и выявляют наличие антиспермальных антител.

*Дополнительные исследования сперматозоидов включают: определение индексов множественных дефектов сперматозоидов, тест на гипоосмотическое набухание, посев эякулята и биохимический анализ функций придаточных половых желез.*

#### **4.1 Подсчет сперматозоидов (кинезиограмма)**

Оценка подвижности сперматозоидов и разделение их по группам - субъективный фактор. Существует несколько рекомендаций по способам определения подвижности. Ниже приведено разделение подвижности сперматозоидов в соответствии с рекомендациями ВОЗ.

**Подвижность каждого сперматозоида классифицируется по категориям a, b, c, d, при этом используются следующие критерии:**

- ***a - быстрое поступательное движение*** (т.е.  $>25$  мкм/с при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  и  $>20$  мкм/с при  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 25 мкм примерно соответствуют длине пяти головок или половине длины хвоста нормального сперматозоида);
- ***b - медленное, вялое поступательное движение;***
- ***c - непоступательное*** (колебательное или маятникообразное, манежное), скорость движения менее 5 мкм/с;
- ***d - неподвижные сперматозоиды.***

*В окуляр с десятикратным увеличением вкладывают окошко Фонио и с объективом, увеличивающим в 40 раз, подсчитывают 100 или 200 сперматозоидов.*

*В первые 3-5 с регистрируются проходящие через поле зрения, ограниченное окошком Фонио, активные, подвижные сперматозоиды (a), в следующие 3-5 с - малоподвижные сперматозоиды с поступательным движением (b), после них отмечают сперматозоиды с непоступательным движением*

*(маятникообразным и манежным) (с) и, наконец, с помощью движения микровинта регистрируются лежащие на предметном стекле (на нижнем уровне препарата) неподвижные сперматозоиды (d).*

*Препарат резко передвигают, после чего регистрируют сперматозоиды в новом поле зрения в том же порядке. Не рекомендуют изучать подвижность сперматозоидов по краю покровного стекла. Если сперматозоидов мало, подсчет проводят без окошка Фолио.*

#### **Подвижность сперматозоидов считается нормальной, если:**

- не менее 50% сперматоцитов относится к категории подвижности а + b;
- не менее 25% сперматоцитов относится по подвижности к быстрым с поступательным движением (категория а).
- Дискинезия- маятникообразное, или манежное, движение сперматозоидов, в норме составляет 2%.

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

#### **4.2 Предварительная оценка концентрации сперматозоидов**

В рекомендациях ВОЗ предлагается проводить предварительную оценку концентрации сперматозоидов в нативном препарате. При увеличении в 400 раз диаметр поля зрения в различных микроскопах варьирует в пределах между 250 и 400 мкм, что соответствует 1-2,5 нл при толщине препарата 20 мкм. Подсчитать диаметр поля зрения можно с помощью окуляр-микрометра или по решетке счетной камеры.

Если количество сперматозоидов в поле зрения, соответствующем 1 нл, менее 15, сперму разводят теплым (37 °С) изотоническим раствором натрия хлорида 1:5; если 15-20, разводят 1:10; если 40-200 - 1:20; если более 200 - 1:50 или 1:100.

Если в 1 нл присутствует очень мало сперматозоидов (всего 1-2), что соответствует  $1-2 \times 10^6$ /мл сперматозоидов, для клинических целей необходимо сделать запись о малом количестве, а для повышения их концентрации и точного подсчета провести центрифугирование (обогащение).

Если количество сперматозоидов в каждом отдельном поле зрения значительно колеблется, это свидетельствует о негомогенности образца. Причиной негомогенности может быть плохое перемешивание - следует еще

раз перемешать сперму. Если негетерогенность сохраняется, это следствие патологической консистенции и разжижения образца, агрегации сперматозоидов в слизи или их агглютинации.

- **Нормозооспермия.** У здорового мужчины в эякуляте в 1 мл содержится более 20 млн сперматозоидов. Общее количество сперматозоидов в эякуляте - более 40 млн.
- **Полизооспермия.** Количество сперматозоидов в 1 мл эякулята превышает 150 млн.
- **Олигозооспермия.** В 1 мл эякулята содержится менее 20 млн сперматозоидов. Количество сперматозоидов между 10 и 20 млн/мл обозначается как *олигозооспермия I степени*, менее 10 млн/мл - как *олигозооспермия II степени*.
- **Азооспермия-** сперматозоиды при микроскопическом исследовании в нативном препарате и осадке эякулята после центрифугирования не обнаружены. Могут присутствовать клетки сперматогенеза.
- **Аспермия-** нет эякулята.

Для определения при олигозооспермии истинного количества сперматозоидов необходимо провести 2-3 контрольных подсчета с интервалом 3-4 нед.

*Транзиторная и старческая олигозооспермия.* У одного и того же мужчины количество сперматозоидов подвержено большим физиологическим колебаниям. У пожилых людей олигозооспермия связана с инволюцией половых желез.

**Истинную олигозооспермию могут вызвать следующие патологические процессы:**

- **Обструкция семявыносящих путей** - разделяется на врожденную и приобретенную. Предположить обструкцию можно, если после центрифугирования спермы в осадке отсутствуют не только сперматозоиды, но и клетки сперматогенеза. К приобретенной обструкции семявыносящих путей приводят хронические воспаления верхних отделов мочеполовых путей, вызванные гонококками, хламидиями, микобактериями туберкулеза.
- **Муковисцидоз** - у таких больных сперма может не содержать сперматозоидов и клеток сперматогенеза, а pH эякулята может быть ниже 7,0 (кислая реакция). Патология связана с нарушением функций

семявыносящих путей, причем у этих пациентов также может быть обнаружена атрезия эпидидимиса и семенных пузырьков.

- **Тестикулярная дисфункция** - может привести к нарушению сперматогенеза. При непосредственном поражении яичек (гонад) возникает первичный гипогонадизм. При нарушении гипоталамо-гипофизарной регуляции сперматогенеза развивается вторичный гипогонадизм.
  - Первичный гипогонадизм может быть врожденным и приобретенным. Врожденный гипогонадизм обусловлен наследственными генетическими аномалиями и дефектами развития.
- **Наследственные генетические аномалии:** синдромы Клайнфельтера и Шерешевского-Тернера, хромосомные aberrации, мутации AZF области Y (синдром «только клетки Сертоли»), наследственные синдромы с нормальным кариотипом (синдром Нуан), низкая чувствительность к андрогенам.
- **Врожденные дефекты развития:** крипторхизм, врожденный анорхизм, первичная недостаточность клеток Лейдига.

**Приобретенный первичный гипогонадизм развивается при:**

- травматических или инфекционных орхитах,
- синдроме сдавления,
- варикоцеле,
- новообразованиях половых органов,
- лейкемии,
- злокачественной лимфоме,
- повреждении спинного мозга,
- при печеночной и почечной недостаточности,
- после облучения,
- при действии токсичных препаратов,
- психологических стрессах
- у людей пожилого возраста.

Диагностика приобретенного гипогонадизма складывается из изучения анамнестических данных, гормонального статуса и общеклинических исследований.

**Вторичный гипогонадизм вызывается нарушением регуляторной функции гипоталамо-гипофизарной системы.** В крови у этих пациентов снижено содержание гонадотропных гормонов (гипогонадотропный

гипогонадизм). Дефицит гонадотропинов может быть вызван как первичной патологией гипофиза, так и нарушением секреции гонадотропин-рилизингфакторов гипоталамуса (GnRH). У таких пациентов в крови снижен уровень тестостерона (идиопатический гипогонадизм). К этой категории патологии относятся синдром Кальмана (врожденный дефект гипоталамуса с дефицитом GnRH), синдром Прадера-Вилли, синдром фертильных евнухов с характерным дефицитом ЛГ и тестостерона на фоне нормальной концентрации фолликулостимулирующего гормона (ФСГ).

***Астенозооспермия*** - снижение подвижности сперматозоидов.

## **5. Сперматограмма**

**Сперматограмма** - совокупность количественного и качественного исследования морфологии сперматозоидов в окрашенных препаратах.

Проводят последовательный подсчет 200 сперматозоидов (однократный подсчет 200 сперматозоидов предпочтительнее двукратного 100 сперматозоидов).

Несмотря на то что для снижения погрешности и вариабельности желательно проводить двукратный подсчет 200 сперматозоидов, в практическом плане нецелесообразно это делать для каждого образца. Однако в ситуациях, когда от результата зависят постановка диагноза и выбор метода терапии, для повышения точности следует проводить двукратный подсчет 200 сперматозоидов.

### **5.1 Нормальная сперматограмма**

Для определения понятия морфологической нормы сперматозоидов приняты строгие критерии, представленные выше. Любые отклонения, все пограничные формы сперматозоидов должны быть отнесены к патологическим. Столь жесткие требования связаны с тем, что имеются данные о прогностической ценности морфологической классификации сперматозоидов для оценки результатов оплодотворения. Только полноценные сперматозоиды способны проникать в верхний отдел цервикального канала женщины. Эти сперматозоиды прошли селекцию в цервикальном секрете и могут рассматриваться как сперматозоиды нормальной морфологии. Строгие критерии, предъявленные для оценки морфологии нормальных сперматозоидов, приняты большинством исследователей.

Однако даже у здоровых мужчин сперматозоиды обладают выраженной гетерогенностью и отличаются размерами и строением головки, шейки и хвоста (жгутика). Количество нормальных форм в эякуляте, принимаемое за референтное значение, в разных источниках существенно различается - от 30 до 87%, чаще всего указывается, что нормальной считается спермограмма, в которой не менее 30% нормальных сперматозоидов. В руководстве ВОЗ указывается, что со снижением частоты оплодотворения связано уменьшение количества морфологически нормальных сперматозоидов ниже 15% *in vitro*.

### 5.1 Патологические формы сперматозоидов

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

**Дефекты шейки и средней части:** «склоненная» шейка (шейка и хвост образуют угол 90° к длинной оси головки), асимметричное прикрепление средней части к головке, утолщенная или неравномерная средняя часть, патологически тонкая средняя часть (отсутствие митохондриальной оболочки) и их любая комбинация.

**Дефекты хвоста:** короткие, множественные, в виде шпильки, сломанные, наклонные (угол больше 90°), неравномерная толщина хвоста, тонкая средняя часть, закрученный конец (иногда полностью) и их любая комбинация.

**Цитоплазматическая капля** занимает более 1/2 головки нормального сперматозоида.

При дифференцированном морфологическом подсчете учитываются **только сперматозоиды с хвостами**. Не следует учитывать клетки сперматогенеза, вплоть до стадии круглых сперматид. Сперматозоиды без хвоста или с неплотно прилегающим хвостом при подсчете не учитываются. Однако их наличие следует отметить отдельно. Для сперматозоидов со скрученными хвостами характерна низкая подвижность. Их наличие может быть показателем того, что сперматозоиды подверглись гипоосмотическому стрессу.

Иногда большое количество сперматозоидов может иметь специфический структурный дефект - *отсутствие акросомы*. Для этих сперматозоидов характерны маленькие круглые головки, такое состояние носит название «глобозоспермия».

*Неспособность базальной пластинки прикрепляться к ядру на полюсе, противоположном акросоме, приводит к отделению головки от хвоста. Головки фагоцитируются клетками Сертоли, и в эякуляте можно обнаружить только отдельные хвосты или так называемые булавоочные головки. Булавоочные головки (отделенные хвосты) не учитывают при подсчете как дефект головки, так как очень редко в головках этих сперматозоидов, кпереди от базальной пластины, можно обнаружить хроматин или другие структуры. Однако факт наличия большого количества сперматозоидов с булавоочными головками следует отметить.*

**Тератозоспермия-** увеличение количества патологических форм сперматозоидов выше определенных значений.

***Выраженная тератозоспермия резко снижает шансы оплодотворения и увеличивает вероятность пороков развития у плода, если оплодотворение произошло. Тератозоспермия обычно сочетается с олигозооспермией и астенозооспермией.***

*В нативном препарате при увеличении в 400 раз относительно хорошо видны почти все патологические особенности сперматозоидов, касающиеся размера и формы головки, ее расположения по отношению к шейке, количества головок; длины, ширины, формы, расположения хвоста по отношению к головке, длины и количества хвостов; размера и расположения цитоплазматической капли. Более четкое представление о патологии сперматозоидов можно получить на иммерсии при увеличении в 900 или 1000 раз.*

Сперматозоиды, у которых головка заключена в цитоплазматическую каплю, и те, у которых цитоплазматическая капля расположена на шейке в виде шарфа, составляя более  $\frac{1}{2}$  размера головки, считаются незрелыми, или юными. В нормальной спермограмме они составляют около 1%. *Увеличение содержания незрелых сперматозоидов указывает на частые половые акты, а также отмечается при варикоцеле. Количество незрелых сперматозоидов при варикоцеле снижается после операции.*

Хроматиновая структура головки, размер акросомы, наличие вакуолей в акросоме и хроматине ядра головки диагностируются в препарате,

окрашенном азур-эозином. Увеличение относительного количества сперматозоидов с двумя головками и двумя хвостами связывают с поражением сперматозоидов вирусом.

- Глобулозооспермию (округление головки) объясняют полным или частичным отсутствием акросомы.
- Удлиненные головки, макроголовки и множественные хвосты обнаруживают у мужчин, у которых повышено количество полиплоидных и анеуплоидных сперматозоидов.
- Микроделеции локуса азооспермии (AZF-локуса) длинного плеча Y-хромосомы могут давать широкий спектр аномалий. Эта патология может привести к полному отсутствию половых клеток (синдрому «только клетки Сертоли») или к атипичности их структуры. Искусственное оплодотворение этими сперматозоидами может передать такую мутацию потомку мужского пола.

Подсчет индексов множественных дефектов сперматозоидов. Сперматозоиды с патологической морфологией часто имеют множественные дефекты. Ранее в протоколах фиксировали только один дефект, предпочтение отдавалось дефектам головки.

**В настоящее время часто подсчитывают индекс тератозооспермии (ИТЗ) или индекс множественных аномалий (ИМА), т.е. число дефектов, разделенное на число патологических сперматозоидов.**

С помощью этих индексов прогнозируется функция сперматозоидов как *in vivo* (экстракорпоральное оплодотворение - ЭКО), так и *in vitro* (фертильность эякулята). Отдельно выделяют дефекты головки, средней части, хвоста. *Значение ИТЗ лежит в пределах от 1,0 (каждый патологический сперматозоид имеет только один дефект) до 3,0 (каждый патологический сперматозоид имеет дефекты головки, средней части и хвоста).* Имеются данные, что при ИТЗ более 1,6 снижается частота беременностей.

## **5.2 Жизнеспособность сперматозоидов**

Под жизнеспособностью подразумевается доля (в процентах) живых сперматозоидов, которые определяются либо по исключению красителя, либо по гипоосмотическому набуханию.

*Жизнеспособность следует определять только в том случае, если количество неподвижных сперматозоидов превышает 50%.*

Оценка жизнеспособности может служить контролем оценки подвижности сперматозоидов, поскольку процент мертвых клеток не должен превышать процента неподвижных сперматозоидов.

Наличие большого количества живых, но неподвижных сперматозоидов указывает на структурные дефекты жгутиков. Если количество неподвижных сперматозоидов в нативном препарате превышает 50% или все сперматозоиды неподвижные, необходимо решить, что произошло со сперматозоидами - имеет ли место акинозооспермия или некрозооспермия.

**Некрозооспермия** - неподвижность сперматозоидов. Она может быть связана с патологией хвоста (генетически обусловленным дефектом строения акронемы - синдромом Картегенера) или присутствием в эякуляте мертвых сперматозоидов.

#### **Дифференциальная диагностика живых и мертвых сперматозоидов**

Суправитальную окраску по Блюму проводят для решения вопроса о дифференцировке живых и мертвых сперматозоидов.

- *Живые сперматозоиды бесцветные, мертвые окрашены в оранжево-красный цвет. Нормальным считается эякулят, в котором не менее 75% живых сперматозоидов, т.е. сперматозоидов, которые не окрасились.*

**Тест на гипоосмотическое набухание** проводят для решения вопроса о дифференцировке живых и мертвых сперматозоидов. Набухание сперматозоидов идентифицируют по изменению формы их хвостов. **Результаты считаются нормальными, если хвосты набухли более чем у 60% сперматозоидов.** Если набухание хвоста произошло менее чем у 50% сперматозоидов, данный биологический материал расценивается как патологический, в котором больше половины сперматозоидов мертвы.

#### **Динамическое исследование эякулята**

Повторные исследования проводят через 3, 6 и 24 ч после получения эякулята. Исследования выполняют по стандартным методикам, определяющим следующие параметры:

- Через 3 и 6 ч:
  - подвижность сперматозоидов;
  - жизнеспособность сперматозоидов;
  - вязкость эякулята;

- агглютинацию сперматозоидов.
- Через 24 ч:
  - подвижность сперматозоидов;
  - жизнеспособность сперматозоидов;
  - вязкость эякулята;
  - агглютинацию сперматозоидов.

### 5.3 Морфология других клеточных элементов спермы

Клетки эякулята, кроме сперматозоидов, в совокупности обозначают как круглые клетки. Их количество не должно превышать  $5 \times 10^6$ /мл спермы.

**Лейкоциты.** Эякулят здорового мужчины содержит лейкоциты. Это нейтрофилы, количество которых не должно превышать  $1 \times 10^6$ /мл. Повышенное количество лейкоцитов носит название «лейкоспермия». Если содержание лейкоцитов изменяет белый цвет спермы на серовато-зеленоватый, можно говорить о *пиоспермии*. Это круглые сероватые мелкозернистые клетки диаметром 14-16 мкм. Диаметр нейтрофилов в сперме всегда несколько больше, чем в кислой моче, так как рН спермы обычно равен 7,5-8,0. Если рН спермы на верхней границе нормы или превышает ее, клетки разбухают еще больше, просматривается броуновское движение нейтрофильных гранул и видны сегментированные ядра.

Повышенная концентрация лейкоцитов коррелирует с бактериоспермией. Обнаружение лейко- или пиоспермии служит сигналом к проведению бактериологического исследования эякулята.

Лейкоспермия влияет на процессы, происходящие в репродуктивной системе. Лейкоциты активируются при антигенной стимуляции и продуцируют большое количество активных кислородных радикалов, которые способны поражать мембраны сперматозоидов. Низкая концентрация кислородных радикалов не влияет на жизнеспособность сперматозоидов, но уменьшает их подвижность, влияя на сократительные белки жгутика. При высокой концентрации кислородные радикалы спермы вступают в реакцию с фосфолипидами клеточных мембран, индуцируют перекисное окисление жирных кислот в мембранах и приводят к гибели клеток. В эякуляте человека сперматозоиды также способны образовывать кислородные радикалы, но нейтрофилы - более мощный их источник. Кислородные радикалы необходимы для нормального процесса оплодотворения. В норме поражающий эффект кислородных радикалов в сперме практически отсутствует, так как сперматозоиды и спермоплазма имеют защитную систему, регуливающую концентрацию кислородных

радикалов. Защитная система состоит из ферментов и ряда антиоксидантов, таких как альбумин, глутатион, пируват и витамины Е и С. В семенной плазме мужчин, страдающих бесплодием и астенозооспермией, содержание антиоксидантов значительно ниже, чем у фертильных.

Лейкоспермия и, вероятно, агрегация нейтрофилов при их нормальной концентрации в сперме указывают на воспалительный процесс в органах репродуктивной системы, особенно часто это происходит в придаточных железах. Лейкоспермия снижает вероятность оплодотворения. На фоне лейко- и пиоспермии выявляются инфекционные и вирусные агенты, вызвавшие воспаление, следовательно, лейко- и пиоспермия - маркеры возможной передачи инфекции между половыми партнерами.

**Клетки сперматогенеза (незрелые половые клетки)** - сперматогонии, сперматоциты и сперматиды. В сперме чаще всего встречаются сперматоциты и сперматиды на разных стадиях созревания. Клетки сперматогенеза хорошо различимы в нативном препарате. Это клетки правильной круглой формы, разных размеров (размером с нейтрофилы или в 1,5-2 раза больше), характеризуются плотной, гомогенной консистенцией цитоплазмы (увеличение в 400 раз), на фоне которой просматриваются одно или несколько ядер, также плотной структуры и округлой формы.

Дифференциальную диагностику круглых клеток и патологических сперматозоидов проводят в фиксированных и окрашенных препаратах. В окрашенных гематологическими красителями препаратах спермы выявляются клетки сперматогенеза, остаточные тельца, плоский, переходный и цилиндрический эпителии, макрофаги, спермиофаги, лейкоциты, эритроциты, трихомонады.

У сперматозоидов прокрашиваются головка, распределенный в ней хроматин и акросомальная зона, цитоплазматические капли на шейке и головке, хвост и шейка.

**Сперматогонии**- неоднородная популяция, состоящая из клеток типа А и В. Сперматогонии типа А подразделяются на темные и светлые клетки. Для ядер обоих вариантов клеток типа А характерно преобладание деконденсированного хроматина, имеющего вид мелких зерен. В светлых клетках типа А зерна так распределены по ядру, что в световом микроскопе оно кажется бледноокрашенным. Хроматин темных клеток типа А также относится к деконденсированному типу, он недостаточно собран в глыбки, тем не менее его конденсация настолько выражена, что в окрашенном препарате ядро окрашено более интенсивно (темное). Вблизи ядерной

оболочки ядер светлых и темных сперматогоний всегда есть ядрышки. В сперматогониях типа В ядра более крупные, хроматин в них часто собирается в глыбки. Эти клетки делятся и образуют дочерние клетки - сперматоциты I порядка.

**Сперматоциты I порядка**, так же как и сперматогонии, в норме находятся в яичках, но при тяжелом поражении сперматогенеза могут быть обнаружены в эякуляте. Это крупные клетки, обычно овальной или круглой формы, в 3-3,5 раза больше эритроцита по диаметру (21-24 мкм). Соотношение ядра и цитоплазмы сдвинуто в сторону ядра. Ядро овальной или круглой формы. Нити хроматина рыхло переплетаются между собой, напоминая структуру ядер мегалобластов. На фоне хроматина можно видеть единичные ядрышки. Цитоплазма базофильная, достаточно широким ободком окружает ядро. Вокруг ядра видна зона просветления. В результате деления из этих клеток образуются сперматоциты II порядка.

**Сперматоциты II порядка** в норме находятся в канальцах яичек и появляются в сперме при нарушении сперматогенеза. Клетки круглой формы, их диаметр в 2-2,5 раза превышает диаметр эритроцита, составляя 14-18 мкм. Ядро или два ядра округлой формы, нити хроматина переплетаются между собой рыхло. Часто встречаются сперматоциты II порядка в стадии деления (профазы). Ядрышки не видны или видны нечетко. Цитоплазма базофильная, с сероватым оттенком, достаточно широким ободком окружает ядро. Зона просветления вокруг ядра (ядер) иногда не видна. Путем деления сперматоциты II порядка образуют дочерние клетки - сперматиды.

**Сперматиды** также находятся в семенных канальцах яичек. Они не делятся, а постепенно созревают, образуя сперматозоиды. Вначале это небольшие, диаметром 10-12 мкм, клетки круглой формы с круглым ядром хроматиновой, но более плотной структуры. Затем они увеличиваются в размерах, постепенно вытягиваются, удлиняются, ядро уменьшается, теряет хроматиновую структуру и сдвигается к проксимальному концу клетки (концу, обращенному к стенке семенного канальца). Проксимальный конец ядра заостряется, и одна из двух центриолей, расположенных вблизи закругленного конца ядра, формирует хвост (жгутик). В окрашенных азур-эозином препаратах эякулята сперматиды по структуре ядра, цвету и гомогенности цитоплазмы напоминают полихроматофильные мегалобласты. Форма сперматид круглая, неправильная, полигональная или вытянутая. Эти изменения формы клетки происходят при созревании сперматид в семенном канальце. Соотношение ядра и цитоплазмы резко сдвинуто в сторону цитоплазмы. Ядра круглой или неправильной округлой формы, могут

занимать 1/3 или 1/6-1/10 часть клетки и располагаться центрально (круглые сперматиды) или эксцентрично. Хроматиновая структура в более крупных ядрах частично сохранена, мелкие ядра могут быть гиперхромными, бесструктурными или частично сохранять хроматиновую структуру. Более крупные ядра обычно расположены в цитоплазме центрально, мелкие - эксцентрично, практически у края цитоплазмы. Окраска цитоплазмы сперматид полихроматофильная - от серовато-синей до серой. При нарушении сперматогенеза сперматиды в большом количестве обнаруживают в эякуляте, иногда в сочетании со сперматоцитами II порядка и остаточными тельцами (свободными цитоплазматическими каплями).

**Остаточные тельца** (свободные цитоплазматические капли или фрагменты цитоплазмы сперматид) образуются в процессе формирования сперматозоида или разрушения сперматид (неэффективный спермиогенез). В норме процесс созревания сперматозоида и освобождение его от цитоплазматической капли происходят в семенном канальце, где клетки Сертоли, или эпителиальные клетки эпидидимиса, фагоцитируют эти остатки цитоплазмы. **Остаточных телец в нормальном эякуляте практически нет.** Появление остаточных телец в эякуляте обычно сочетается с появлением клеток сперматогенеза (сперматид, иногда в сочетании со сперматоцитами).

**Макрофаги.** Это большие клетки круглой формы, диаметром 20-36 мкм, с эксцентрично расположенным ядром. В окрашенных азур-эозином препаратах цитоплазма широким ободком окружает ядро больше с одной стороны, вакуолизирована, в вакуолях можно видеть лейкоциты, фрагменты ядер или целые ядра разрушенных клеточных элементов, бактерии. В сперме здорового мужчины макрофагов нет. **Макрофаги появляются в сперме больных, страдающих хроническими специфическими и неспецифическими воспалениями простаты, эпидидимиса и др.**

**Спермиофаги** - макрофаги, фагоцитирующие сперматозоиды. Спермиофаги - круглые клетки диаметром до 30-40 мкм, в цитоплазме которых в нативном и окрашенном азур-эозином препаратах видны в основном головки сперматозоидов. Иногда можно видеть спермиофаги, заполненные головками сперматозоидов, а из их цитоплазмы по окружности, как лучи, торчат хвосты частично заглоченных сперматозоидов. В норме в канальцах эпидидимиса роль макрофагов выполняют эпителиальные клетки (спермиофаги эпидидимиса), которые фагоцитируют цитоплазматические капли, «брошенные» с шейки созревших сперматозоидов. **Появление в сперме спермиофагов обусловлено длительным застоем спермы в эпидидимисе,**

**выходом в результате редких эякуляций из эпидидимиса неполноценных или старых сперматозоидов.**

**Эритроциты.** В нативном и окрашенном азур-эозином препаратах эритроциты выглядят так же, как и в любом другом биологическом материале. В нативном препарате это правильной круглой формы бледно-желтые клетки с просветлением в центре диаметром 7-9 мкм, лежащие разрозненно или скоплениями. В сперме здоровых мужчин эритроцитов нет.

Появление эритроцитов в эякуляте носит название «гемоспермия». Гемоспермия может быть истинной и ложной. Ложная гемоспермия - появление эритроцитов в сперме в результате острой микротравмы (грубой мастурбации, исследования спермы, полученной на следующий день после инструментального исследования мочевого пузыря или взятия материала из мочеиспускательного канала для бактериологического исследования). Истинная гемоспермия наблюдается при воспалении добавочных желез, новообразованиях.

**Эпителиальные клетки.** Клетки многослойного плоского эпителия с ороговением смываются с головки полового члена и крайней плоти. Клетки переходного эпителия выстилают простатическую часть мочеиспускательного канала в его начальных участках. Самую короткую, перепончатую часть мочеиспускательного канала длиной 1 см и самую длинную, губчатую его часть выстилает высокий многослойный цилиндрический эпителий. Ладьевидная ямка мочеиспускательного канала выстлана бокаловидными клетками, а ее дистальная часть - многослойным плоским неороговевающим эпителием.

В нативном препарате клетки ороговевающего многослойного плоского эпителия - это бесцветные крупные, полигональной или округлой формы клетки с маленькими круглыми, в виде пузырька ядрами. В препаратах, окрашенных азур-эозином, клетки поверхностного слоя крупные, диаметром 35-55 мкм, полигональной формы, с ядром диаметром 4-6 мкм, пикнотичным, гиперхромным. Цитоплазма клеток слабоокрашена, серовато-голубая или серая. В сперме здорового мужчины можно обнаружить единичные клетки ороговевшего поверхностного слоя многослойного 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. В нативном препарате спермы это округлой

формы крупные клетки с маленькими пузырьковидными ядрами на фоне обильной бесструктурной цитоплазмы. В препаратах, окрашенных азур-эозином, это крупные клетки диаметром 30-35 мкм, овальной или круглой формы. Цитоплазма обильная, окрашивается в светло-базофильные тона. Ядро диаметром 8-9 мкм расположено центрально, круглой или овальной формы, с частично сохранившейся хроматиновой структурой.

Цилиндрический многослойный эпителий выстилает губчатую (перепончатую) и дистальную (простатическую) части мочеиспускательного канала. Поверхностно расположенные клетки могут отторгаться во время семяизвержения и выявляться в сперме. В нативном препарате они имеют вытянутую форму, расширенный апикальный и заостренный дистальный конец, обладают хвостиком (хвостатые клетки). Это клетки обычно находятся в состоянии дистрофии ядра и цитоплазмы.

Переходный (многослойный) эпителий выстилает начальные участки простатической части мочеиспускательного канала, дистальные участки семяизвергающих каналов и простатических ходов. Поверхностные клетки многослойного переходного эпителия в нативном препарате округлой и неправильной округлой формы («помятые»). При большом увеличении на фоне обильной цитоплазмы видны одно, два или три ядра. Цитоплазма этих клеток обычно находится в состоянии дистрофии: грубозернистой белковой, вакуольной или жировой. В препарате, окрашенном азур-эозином, это округлой или полигональной формы клетки, содержащие 1-3 ядра и более, занимающих меньшую часть клеток. Цитоплазма окрашена в насыщенно базофильные или светло-базофильные тона. Ядра гиперхромные, грубоглыбчатые, могут быть в состоянии кариолизиса или кариорексиса.

## **6. Выявление антител к сперматозоидам**

Антитела к сперматозоидам относятся почти исключительно к двум классам иммуноглобулинов - IgA и IgG. Исходя из того что IgA функционируют в большей степени на поверхности, определяя барьерный иммунитет, а сперматоциты в тестикулах отделены от остального организма гематотестикулярным барьером, считается, что антитела класса IgA имеют большее клиническое значение, чем антитела класса IgG. Антитела класса IgM в эякуляте выявляют очень редко из-за большого размера их молекул.

Скрининг на наличие антител проводят в нативном эякуляте. При этом используют либо **тест с иммунными шариками**, либо **тест на смешанную антиглобулиновую реакцию (МАР-тест)**. Результаты теста с иммунными

шариками и МАР-теста не всегда согласуются. Если результаты этих тестов положительны, для подтверждения диагноза необходимо провести дополнительные исследования, в частности тест на взаимодействие сперматозоидов с цервикальной слизью.

### **Тест с иммунными шариками**

С помощью прямого теста с иммунными шариками можно выявить антитела на поверхности сперматозоидов. Иммунные шарики представляют собой полиакриламидные сферы, ковалентно связанные с кроличьими античеловеческими иммуноглобулинами. С помощью этого теста одновременно можно определять наличие антител класса IgA и IgG.

Сперматозоиды отделяют от семенной жидкости двукратным центрифугированием, осадок смешивают с буфером для получения суспензии. Суспензию сперматозоидов смешивают с суспензией иммунных шариков. Полученный препарат исследуют под фазово-контрастным микроскопом при увеличении в 400 раз. Иммунные шарики склеиваются с подвижными сперматозоидами, на поверхности которых имеются антитела. Проводят подсчет сперматозоидов (в процентах), связанных с шариками, отмечают характер связывания. Класс антител можно установить, применяя различные наборы иммунных шариков. *Считается, что не менее 50% подвижных сперматозоидов должны быть покрыты антителами, чтобы существенно нарушилась пенетрация сперматозоидами цервикальной слизи и не произошло оплодотворение in vivo.* На основании этого, как минимум, 50% подвижных сперматозоидов должны быть связаны с иммунными шариками, чтобы тест можно было считать клинически значимым. Связывание иммунных шариков с кончиками хвостов сперматозоидов необязательно ассоциируется с нарушением фертильности и может встречаться у здоровых мужчин.

### **Непрямой тест с иммунными шариками (антиспермальные антитела)**

Непрямой тест с иммунными шариками предназначен для обнаружения антиспермальных антител в инактивированной нагреванием сыворотке, семенной плазме и цервикальной слизи, разведенной бромелайном.

### **Тест на смешанную антиглобулиновую реакцию (МАР-тест)**

МАР-тест с антителами класса IgA и IgG проводят путем смешивания образца нативного эякулята с частичками латекса или с эритроцитами, покрытыми человеческими антителами класса IgA или IgG. К этой смеси добавляют моноспецифическую античеловеческую IgG-антисыворотку.

Образование смешанных агглютинатов показывает, что сперматозоиды покрыты IgA или IgG. Диагноз «иммунологическое бесплодие» правомочен, если частички прикреплены не менее чем к 50% подвижных сперматозоидов. Диагноз нужно подтвердить тестами с цервикальной слизью.

### **6.1 Исследование взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью**

Эпителий слизистой оболочки шейки матки состоит из секреторных клеток различного типа. Природа и количество секреторных клеток варьируют в различных частях шейки матки. Продукты секреции этих клеток входят в состав цервикальной слизи. Гормоны яичника регулируют секрецию цервикальной слизи. Изменение объема секреции носит циклический характер. У здоровых женщин репродуктивного возраста суточная продукция слизи колеблется от 0,5 мл в середине менструального цикла до менее 0,1 мл в другие фазы цикла. В состав цервикальной слизи входит небольшое количество эндометриальной, трубной и, возможно, фолликулярной жидкости. Кроме того, в цервикальной слизи присутствуют лейкоциты и клеточный детрит из эпителия слизистой оболочки матки и цервикального канала. Цервикальная слизь - гетерогенный секрет, состоящий из компонентов высокой и низкой вязкости. Ее характеризуют по консистенции, растяжимости и кристаллизации. Компонент высокой вязкости состоит из муцина - волокнистой системы, построенной из пептидного ядра и олигосахаридных боковых цепей. К компоненту низкой вязкости относятся электролиты, органические соединения и растворимые белки. Циклические изменения составных частей цервикальной слизи могут влиять на проникающую способность и выживаемость сперматозоидов.

**Сперматозоиды способны пенетрировать цервикальную слизь приблизительно с 9-го дня нормального 28-дневного менструального цикла, и эта способность постепенно усиливается, достигая своего пика непосредственно перед овуляцией.** После этого способность к пенетрации снижается, причем раньше, чем наступают видимые изменения в характере цервикальной слизи. Часто отмечается индивидуальная вариабельность во времени и степени проницаемости слизи для сперматозоидов. Подвижные сперматозоиды, направляемые волокнами цервикальной слизи, попадают в цервикальные крипты, где они могут собираться, а затем постепенно проникать в матку и фаллопиевы трубы.

Шейка матки и ее секрет восприимчивы к пенетрации сперматозоидами во время или перед овуляцией и создают барьер для пенетрации в другие фазы цикла, защищают сперматозоиды от агрессивной среды влагалища и фагоцитоза. В слизи шейки матки происходит селекция сперматозоидов за счет разницы в подвижности и морфологии, а также инициация капацитации сперматозоидов. В настоящее время отсутствуют методы, с помощью которых можно было бы на практике оценить влияние маточной и трубной жидкости на сперматозоиды. Цервикальная же слизь легкодоступна для взятия образца и исследования. Оценка взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью очень важна, ее следует включать в обследование по поводу бесплодия. Выявление нарушения взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью может служить показанием к проведению искусственной внутриматочной инсеминации или к использованию других методов вспомогательных репродуктивных технологий.

Цервикальная слизь в ограниченный период менструального цикла способствует миграции сперматозоидов. Насыщенная эстрогенами цервикальная слизь благоприятна для пенетрации сперматозоидами. Длительность благоприятного периода у разных женщин различна. Более того, этот период варьирует у одной и той же женщины от одного менструального цикла к другому. Следовательно, только после повторения тестов в нескольких циклах можно сделать заключение о нарушении взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью.

### **Тест *in vivo* (посткоитальный)**

**Время проведения.** Посткоитальный тест следует проводить как можно ближе к моменту овуляции, определяемой на основании клинических критериев это:

- обычная продолжительность цикла,
- базальная температура,
- изменения цервикальной слизи,
- цитологическое исследование влагалища,
- если возможно - определение уровня эстрогенов в сыворотке или моче,
- УЗИ яичников

Важно, чтобы каждая лаборатория проводила исследование цервикальной слизи через стандартный промежуток времени после коитуса.

**Это время варьирует в пределах от 9 до 24 ч.**

Рекомендации для пациентов по подготовке к посткоитальному тесту.

- Партнерам следует воздержаться от половых сношений до проведения теста в течение, как минимум, 2 сут. Нужно назвать наиболее подходящий день для проведения теста (дату). Половое сношение должно произойти в ночь накануне этого дня.
- Техника проведения посткоитального теста. Во влагалище вводят зеркало (без смазки) и туберкулиновым шприцем (без иголки), пипеткой или полиэтиленовой трубкой берут образец выделений из заднего свода влагалища. Другим шприцем или катетером берут образец слизи из цервикального канала. Далее каждый образец наносят на отдельное предметное стекло, накрывают покровным стеклом и исследуют при стандартной глубине с помощью фазово-контрастного микроскопа.

**Образец выделений из влагалища.** Обычно сперматозоиды во влагалище погибают в течение 2 ч. Цель исследования образца выделений из влагалища - *установление факта попадания сперматозоидов во влагалище.*

**Образец цервикальной слизи.** Количество сперматозоидов в нижней части цервикального канала варьирует в зависимости от времени, прошедшего после полового сношения. Через 2-3 ч после коитуса в нижней части цервикального канала скапливается большое количество сперматозоидов. Рекомендуют, чтобы концентрация сперматозоидов в слизи выражалась в стандартных единицах (количество сперматозоидов в мм<sup>3</sup>), что аналогично подсчету содержания клеточных элементов в слизи.

По подвижности сперматозоиды в цервикальной слизи классифицируют по категориям:

- быстрое поступательное движение;
- медленное и вялое поступательное движение;
- непоступательное движение;
- неподвижность.

**Наличие любого количества сперматозоидов с быстрым поступательным движением - наиболее важный индикатор нормальной функции цервикальной слизи.**

**Интерпретация результатов.** Целью посткоитального теста считается не только определение количества активных сперматозоидов в цервикальной слизи, но и оценка выживаемости и поведения сперматозоидов спустя много часов после полового сношения (роль резервуара). Следовательно,

проведение теста через 9-24 ч оптимально для оценки жизнеспособности и выживаемости сперматозоидов.

По наличию в слизи цервикального канала любого количества сперматозоидов с быстрым поступательным движением можно сделать вывод, что цервикальный фактор у данной пары не является причиной бесплодия.

При отрицательном или патологическом результате посткоитальной тест следует повторить. Если в цервикальном канале и влагалище не обнаружены сперматозоиды, необходимо расспросить пару, действительно ли была эякуляция и сперматозоиды попали во влагалище. Причиной отрицательного результата теста может быть неправильное время его проведения. Тесты, проведенные слишком рано или поздно, могут дать отрицательные результаты даже у фертильных пар. У некоторых женщин тест может быть положительным только 1-2 сут из всего менструального цикла. Если время овуляции установить точно невозможно, следует повторить тест несколько раз в течение цикла либо провести тесты *in vitro*. Только неоднократно полученный отрицательный результат посткоитального теста в течение нескольких циклов при условии оптимального времени проведения может свидетельствовать о роли цервикального фактора как возможной причины бесплодия.

### **Тесты *in vitro***

Детальное изучение взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью можно провести и с помощью тестов пенетрации *in vitro*. Обычно эти тесты проводят в случае отрицательного результата посткоитального теста. Они наиболее информативны при перекрестном тестировании с использованием сперматозоидов и цервикальной слизи от доноров.

Если целью проведения теста взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью является сравнение качества различных образцов цервикальной слизи, следует использовать один образец эякулята с оптимальными характеристиками концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов. При необходимости оценить качество различных образцов эякулята используют один и тот же образец цервикальной слизи, чтобы иметь представление о способности сперматозоидов к пенетрации этой слизи. Если при использовании эякулята мужчины и слизи женщины результат теста получился отрицательный, можно провести перекрестное тестирование со сперматозоидами и цервикальной слизью доноров, чтобы выяснить, ответственны ли за патологический результат сперматозоиды

и/или цервикальная слизь. Донорскую цервикальную слизь можно получить от женщин, которым проводят искусственную инсеминацию в середине менструального цикла. Цервикальную слизь следует собирать перед инсеминацией в естественном цикле или в цикле стимуляции овуляции гонадотропинами.

Тесты *in vitro* проводят в течение часа после получения образца эякулята. Следует использовать только цервикальную слизь, полученную от женщин в середине менструального цикла. Использование суррогатных гелей, например цервикальной слизи от коров или синтетических гелей, не может быть рекомендовано в качестве эквивалента цервикальной слизи женщины для тестов взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью *in vitro*.

### **Связывание сперматозоидов с прозрачной средой (*zona pelucida*)**

При выполнении гемизонного теста прозрачную зону ооцита микроскопически рассекают точно пополам и инкубируют каждую половину с равным количеством исследуемых сперматозоидов (сперматозоиды пациента) и контрольных (сперматозоиды фертильного донора). Далее рассчитывают так называемый индекс полужоны – отношение количества связанных сперматозоидов пациента к количеству связанных сперматозоидов донора.

Применяют так же дифференциальную окраску сперматозоидов пациента одним флуоресцентным красителем (флуоресцином), а сперматозоидов фертильного донора другим (родамином). После инкубирования с прозрачной зоной подсчитывают число и соотношение тестируемых и контрольных сперматозоидов, связанных с одной и той же интактной зоной.

Вследствие методологической сложности получения ооцитов, требующей специальной стимуляции и использования пункционных процедур – данный тест ограничен в клинической практике.

## **7. Биохимическое исследование спермы**

Поддержание функциональной активности сперматозоидов осуществляется спермоплазмой, в которой содержатся белки и ферменты, микроэлементы, фруктоза, лимонная кислота, карнитин и другие метаболиты. Спермоплазма представляет собой смесь секретов добавочных половых желез. Нормальная деятельность этих желез обеспечивается андрогенными гормонами. Тестостерон стимулирует накопление фруктозы в

семенных пузырьках, лимонной кислоты и микроэлементов в предстательной железе, карнитина в придатках яичка, поэтому уровень этих метаболитов в спермоплазме может косвенно свидетельствовать об андрогенной насыщенности организма и функциональном состоянии желез мужской половой системы.

- Секреция **фруктозы** считается наиболее важной функцией семенных пузырьков, так как это вещество обеспечивает поддержание обмена веществ и подвижности сперматозоидов. **Нормальная концентрация фруктозы в спермоплазме - 10-60 ммоль/л.** Снижение жизнеспособности сперматозоидов сопровождается повышением уровня фруктозы в спермоплазме.
- **Концентрация лимонной кислоты** отражает функциональное состояние предстательной железы и эндокринной функции яичек. **В норме ее более 20 ммоль/л.**
- **Уровень карнитина в спермоплазме - около 0,47 моль/л.** Он попадает в эякулят из придатка яичка (94%) и семенных пузырьков. Карнитин участвует в переносе жирных кислот через мембрану сперматозоида и увеличивает их подвижность.
- Существенное влияние на подвижность сперматозоидов и оплодотворяющие свойства эякулята оказывают такие микроэлементы, как **Fe, Mg, Mn, Zn.** Их секреция осуществляется в основном предстательной железой.

Спермоплазма содержит большое количество белков, которые секретируются в основном предстательной железой и семенными пузырьками. **В норме концентрация общего белка составляет 40-45 г/л.** Ключевые ферменты процесса оплодотворения - *сериновая протеиназа (акрозин) и гиалуронидаза, участвующие в акросомальной реакции.* Их активность находится в прямой зависимости от концентрации сперматозоидов.

- Исследование активности акрозина служит прекрасным тестом для оценки фертильности при подготовке к искусственному оплодотворению.
- Содержание гиалуронидазы находится в прямой зависимости от количества сперматозоидов: с их увеличением концентрация гиалуронидазы в эякуляте возрастает.

## 8. Предварительная оценка сперматозоидов

Нативный препарат просматривается при малом увеличении с окуляром (увеличение в 10 раз) или биноклем (в 7 раз) и объективами (в 8, 10 или 20 раз) со спущенным конденсором или же при поднятом конденсоре и закрытой диафрагме. Определяют качество приготовления нативного препарата: отсутствие пузырьков воздуха, равномерную толщину препарата. В бланке отмечают наличие агглютинации, агрегации сперматозоидов и слизи, а также присутствие эритроцитов, «круглых клеток» (лейкоцитов, клеток сперматогенеза, эпителия и др.) и элементов простаты [кристаллов спермина (Беттхера), лецитиновых зерен и амилоидных телец], а также простейших (*Trichomonas urogenitalis*).

**Агглютинация сперматозоидов** - склеивание подвижных сперматозоидов между собой головками, хвостами или головок с хвостами. В норме у практически здоровых пациентов агглютинации сперматозоидов нет. Агглютинация позволяет предположить наличие иммунологического фактора бесплодия, однако ее нельзя считать доказательством последнего. В бланке отмечают тип агглютинации (головками, хвостами или смешанный вариант) и оценивают **степень агглютинации полуколичественно:**

- «-» - отсутствие агглютинации;
- «+» - слабовыраженная агглютинация (в нативном препарате до 10 кучек по 4-6 сперматозоидов в каждой);
- «++» - значительная агглютинация (в препарате более 20 кучек сперматозоидов);
- «+++» - резко выраженная агглютинация (в препарате более 20 кучек, при этом в каждой более 20 сперматозоидов);
- «++++» - тяжелая степень агглютинации (при которой все подвижные сперматозоиды агглютинированы).

**Агрегация (псевдоагглютинация)** - хаотическое скопление неподвижных сперматозоидов, нагромождение их на комочки или тяжи слизи, клеточные элементы и детрит. Агрегацию и агглютинацию оценивают как отдельные показатели.

**Слизь** в нормальном эякуляте отсутствует. Обнаруживают слизь при воспалении мочеиспускательного канала, бульбоуретральных желез, простаты, простатических ходов и т.д.

При определении вязкости разжиженного эякулята слизь вытягивается из общей массы спермы в виде волокон и тяжелой или густой липкой массы. При нанесении капли спермы на предметное стекло может быть обнаружена

слизь в виде комочков. Происхождение слизи в нативных и окрашенных азур-эозином препаратах определяют по обнаруженным в них эпителиальным клеткам и другим клеточным элементам. **Слизь, в каком бы виде она ни присутствовала в сперме, препятствует движению сперматозоидов и приводит к снижению фертильности (оплодотворяющей способности спермы).**

Из предстательной железы с простатическим соком в сперму попадают липоидные, амилоидные тельца и кристаллы спермина.

*Trichomonas urogenitalis* - простейшее из класса жгутиковых, имеет грушевидную форму, длину 10-20 и ширину 7-10 мкм. Форма тела поддерживается скелетным образованием - аксостилем. В переднем конце тела клетки расположены ядро и пучок из четырех жгутиков. Пятый жгутик, возвратный, проходит по краю ундулирующей мембраны (складки цитоплазмы). Движение простейшего поступательно-колебательное, осуществляется в результате постоянного движения жгутиков; ундулирующая мембрана совершает волнообразные движения, препятствующие вращению клетки. Трихомонады достаточно легко распознаются в нативном препарате спермы, несмотря на активное движение сперматозоидов. Это достаточно крупные клетки, их диаметр в 1,5-3 раза больше диаметра нейтрофила. Более четко строение трихомонад можно определить в препаратах, окрашенных азур-эозином. Это клетки неправильной округлой формы. В переднем конце тела клетки расположено вытянутое, в виде косточки сливы, ядро с четкой хроматиновой структурой, коричневато-вишневого цвета. Сложность лабораторно-диагностических процедур при трихомонозе бывает связана с идентификацией нетипичных округлых и амебовидных форм простейших в клиническом материале.

### **Физиологические колебания подвижности**

Подвижность сперматозоидов зависит от времени года и суток. Имеются сообщения, что весной подвижность сперматозоидов снижается (сезонные колебания). При наблюдении за количеством активных, подвижных сперматозоидов в течение суток было отмечено увеличение их количества во второй половине дня (суточные ритмы). Было также прослежено колебание подвижности сперматозоидов от частоты эякуляции. У пациентов с олиго- и астенозооспермией при эякуляции каждые 4-6 ч отмечалось относительное увеличение количества активных, подвижных сперматозоидов.

Астенозооспермия отмечается примерно у 50% пациентов с нарушением фертильности. Заключение о незначительной степени астенозооспермии можно сделать, если количество активных и малоподвижных сперматозоидов с поступательным движением в сумме составляет менее 50, но более 30%. **Астенозооспермию вызывают эндогенные, генетические и экзогенные факторы.**

- Генетические нарушения строения жгутика.
- Энергетические нарушения, связанные с генетически обусловленными или функциональными дефектами митохондрий.
- Хронические воспалительные заболевания.
- Бактериоспермия.
- Экзогенные токсические факторы.

**Хронические воспалительные заболевания.** Подвижными сперматозоиды становятся в процессе созревания в придатке яичка. Их подвижность меняется по мере продвижения вдоль эпидидимиса. Созревание сперматозоидов обусловлено андроген-зависимыми факторами, которые вырабатывает эпителий эпидидимиса. Эпидидимиты различной этиологии вызывают снижение подвижности сперматозоидов. Астенозооспермия возникает в результате нарушения секреторной функции эпителия эпидидимиса. В период между эякуляциями каудальный отдел эпидидимиса является местом хранения зрелых сперматозоидов, при его воспалении интоксикация поражает сперматозоиды и приводит к астенозооспермии и увеличению количества мертвых клеток.

**Бактериоспермия.** Некоторые микроорганизмы приводят к снижению подвижности сперматозоидов, вызывая их агглютинацию и/или адгезию. Этот процесс зависит от концентрации бактерий в сперме. Так, *invitro E. Coli* значительно снижает подвижность сперматозоидов в концентрации  $10^4$ /мл.

**Экзогенные и токсические факторы.** Исследование следует проводить при температуре не ниже 20 °С, поддерживая ее в помещении на постоянном уровне, иначе будут искажаться результаты оценки подвижности сперматозоидов по категориям. Подвижность сперматозоидов снижается при действии электромагнитных полей, солей тяжелых металлов, свинца, наркотических препаратов, накоплении в сперме кадмия. Экспериментально доказано, что у сперматозоидов, помещенных в магнитное поле, снижается подвижность из-за изменения формы жгутика. По-видимому, действие экзогенных факторов неспецифическое и прямо или косвенно влияет на структуру компонентов жгутиков. Так, у наркоманов были обнаружены

значительные изменения микротрубочек аксономы жгутиков, напоминающие подобные при синдроме Картагенера (сперматозоиды живые, но неподвижные).

### **Акрсомная реакция**

Акрсомная реакция – это процесс экзоцитоза в ходе которого происходит разрыв наружной мембраны акросомы и высвобождение протеолитических ферментов (гиалуронидаза, протеаза, акрозин), позволяющий сперматозоиду пенетрировать яйцеклетку. Физиологическая акросомная реакция происходит после связывания сперматозоида с *zona pelucida*.

Существует 2 вида нарушений акросомной реакции:

1. Спонтанная (преждевременная) акросомная реакция происходит до того, как сперматозоид достигает *zona pelucida*.
2. Отсутствие индукции акросомной реакции при взаимодействии сперматозоида с *zona pelucida*.

### **Оценка индуцированной акросомной реакции**

При оценке акросомной реакции используют подвижные сперматозоиды без контаминации лейкоцитами, незрелыми половыми клетками и нежизнеспособными сперматозоидами. Для индукции капацитации сперматозоиды инкубируют в течение 3-х часов при температуре 37°C в атмосфере 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. В физиологических условиях акросомную реакцию инициирует повышение внутриклеточного кальция. Кальций основной регулятор капацитации, гиперактивации и акросомной регуляции сперматозоидов. В лабораторных условиях использую ионофор кальция для индуцирования выброса кальция. Акрсомный статус можно оценить с помощью флюоресцентной микроскопии, проточной цитометрии с применением флюоресцирующих меченых лектинов (*Pisum sativum* (гороховый аглютинин), *Arachis hypogaea* (ореховый лектин)) или моноклональных антител против акросомного антигена CD46. Необходимо определить процент сперматозоидов у которых произошла спонтанная реакция и процент сперматозоидов у которых реакции произошла после добавления ионофора кальция. Разница между этими величинами определяют долю сперматозоидов потенциально способных к пенетрации яйцеклетки.

Минимальное допустимое пороговое значение (ВОЗ 2010) 15%, значения менее 10% считают аномальным, От 10% до 15% - предполагает нарушенную функцию сперматозоидов, более 15% - указывают на спонтанную акросомную реакцию.

### **Оксидативный стресс**

Активные формы кислорода (АФК) представляют собой кислородосодержащие химически активные молекулы которые играют важную роль в передаче сигналов и гомеостазе клеток. Они представлены: супероксидным анион-радикалом, гидроксильным радикалом, перекисью водорода, синглетным кислородом, гипохлорной кислотой. В репродуктивном тракте мужчины АФК находятся в равновесии благодаря работе антиоксидантной системы.

Существует три группы антиоксидантных систем:

- ферментативные (супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза)
- неферментативная (аскорбиновая кислота, токоферол, урат, глутатион, пируват, таурин и гипотаурин);
- белки-хелаторы (трансферрин, лактоферрин, церуллоплазмин).

Антиоксиданты способны стабилизировать и инактивировать свободные радикалы, тем самым смягчать их повреждающее действие на клетку.

В оптимальных концентрациях АФК активируют сперматогенез, регулируют созревание сперматозоидов и необходимы для капацитации. При увеличении в крови и сперме концентрации АФК и снижении антиоксидантной защиты равновесие нарушается, вызывая оксидативный стресс. В таком состоянии АФК могут угнетать сперматогенез, повреждать полисахаридную мембрану сперматозоидов, приводить к разрывам цепочек ДНК. Ashok Agarwal и соав. В своём исследовании доказали корреляцию между повышенным уровнем АФК в семенной жидкости и патоспермией.

Уровень АФК можно измерить прямым или косвенным методом. В первом случае концентрацию свободных радикалов измеряют с помощью спиновых меток путем электронного парамагнитного резонанса, однако данный метод дорогостоящий, требует технического оснащения и подготовки персонала. В практике наибольшее распространение получил хемилюминесцентный тест. При помощи люминометра измеряют количество

света, выделенного при взаимодействии реагентов и конечных продуктов окисления АФК.

## **10. Индекс фрагментации ДНК сперматозоидов**

По современным представлениям, именно фрагментация ДНК сперматозоидов (ФДС) является одной из главных причин прерывания беременности. В руководстве EAU по диагностике и лечению мужского бесплодия указано, что ФДС снижает шансы на зачатие естественным путем и повышает риск невынашивания беременности.

Согласно руководству по лечению привычного невынашивания беременности, разработанному Европейским обществом специалистов по репродукции и эмбриологии человека (European Society of Human Reproduction and Embryology), необходимо определять индекс ФДС в ходе обследования пары уже после 1 эпизода самопроизвольного прерывания беременности. Ввиду высокой значимости ФДС в современной репродуктивной медицине лавинообразно увеличивается число публикаций, посвященных этой проблеме.

### **10.1 Распространенность, этиология и патогенез фрагментации ДНК сперматозоидов**

**Фрагментация ДНК** – наиболее частое нарушение ультраструктуры сперматозоидов, представляющее собой одно- и двухцепочечные разрывы молекулы ДНК, которые обусловлены уменьшением содержания в хромосомах *протаминов* – специальных белков, защищающих молекулу ДНК от внешних повреждений. ФДС влияет на ранние этапы эмбрионального развития, особенно на формирование бластоцисты, снижая частоту наступления беременности в циклах ЭКО/ICSI.

К основным механизмам, оказывающим влияние на ФДС, относят апоптоз, нарушение созревания хроматина сперматозоидов и окислительный стресс. Согласно данным этих исследований повреждение ДНК может происходить на всех этапах созревания сперматозоида. Апоптоз развивается в процессе созревания сперматозоидов в яичке, но он заканчивается гибелью клеток, поэтому сперматозоиды с апоптотическими признаками могут быть обнаружены в эякуляте. Дефекты созревания хроматина сперматозоидов обусловлены невозможностью репарации тех разрывов ДНК, которые возникают при замене гистонов на протамины во время ремоделирования ядер в сперматидях.

Наконец, окислительный стресс возникает, когда продуцируемые активные формы кислорода (АФК) подавляют антиоксидантную защиту. Окислительный стресс, вероятнее всего, является основным механизмом ФДС, действующим во время прохождения сперматозоидов по мужской половой системе, так как эякулированные сперматозоиды демонстрируют более высокие уровни ФДС, чем тестикулярные.

К основным повреждающим факторам, которые инициируют окислительный стресс в мужских зародышевых клетках, относят:

- инфекции,
- ожирение,
- неблагоприятное воздействие окружающей среды,
- возраст.

Окислительный стресс индуцирует перекисное окисление липидов, вследствие чего появляются альдегиды, связывающиеся с белками в митохондриальной цепи переноса электронов и стимулирующие образование АФК. В свою очередь, АФК усиливает окислительный стресс, что может приводить к апоптозу сперматозоидов. Если апоптоз не привел к гибели сперматозоида, то такой сперматозоид с поврежденной ДНК может оплодотворить яйцеклетку в процессе естественной фертилизации или в цикле ВРТ.

Яйцеклетка обладает потенциалом репарации и способна восстановить часть поврежденной ДНК сперматозоида. Однако если репарация ДНК не произошла, то могут возникнуть мутации, обуславливающие развитие ряда патологических состояний: выкидыша, доминантных генетических заболеваний, комплексных неврологических состояний, рака, нарушений обмена веществ и т.д.

## **10.2 Методы оценки уровня фрагментации ДНК сперматозоидов**

В настоящий момент существует несколько методов оценки уровня ФДС, ниже описаны наиболее широко распространенные из них.

**Метод SCSA (sperm chromatin structure assay, исследование дисперсии хроматина сперматозоидов).** Основан на метахроматических свойствах акридинового оранжевого, который флюоресцирует красным при связывании с одноцепочечной молекулой ДНК и зеленым – при связывании с двухцепочечной. Для проникновения акридинового оранжевого в хроматин сперматозоидов используют высокие температуры и низкий рН, приводящие к деконденсации нуклеопротеидной структуры. Основные преимущества

метода – высокая чувствительность и специфичность, возможность подсчета большого количества сперматозоидов методом проточной цитометрии, объективность количественного анализа ДНК; основными недостатками считают необходимость специального оборудования и высокую стоимость.

**Метод TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling)** – флуоресцентное мечение одно- и двуниевых разрывов ДНК. Интенсивность люминесценции пропорциональна числу встроенных dUTP и, соответственно, числу разрывов ДНК. В качестве флуорохрома обычно используется флуоресцеин. Рассчитывают процент TUNEL-позитивных клеток. Известны и модификации метода, например с использованием антифлуоресцеиновых антител. Метод требует малого числа сперматозоидов. Основными преимуществами метода относят высокую чувствительность и специфичность, возможность подсчета большого количества сперматозоидов методом проточной цитометрии; основные недостатки – необходимость специального оборудования и высокая стоимость.

**Гель-электрофорез ДНК отдельных клеток (single cell gel electrophoresis)**, получивший название comet assay, позволяет определить содержание высоко- и низкомолекулярной ДНК по ореолу низкомолекулярной ДНК, напоминающему хвост кометы и получаемому при мини-электрофорезе клеток, иммобилизованных в агарозном геле. Проводят специальную обработку клеток с использованием протеиназы. Подсчитывают число клеток с «хвостом кометы» относительно общего числа клеток; также измеряют длину «хвоста». Основными преимуществами метода считают невысокую стоимость, высокую чувствительность, возможность количественного анализа повреждений ДНК в отдельных клетках, оценки различных типов повреждений ДНК; основными недостатками – необходимость специального оборудования и проведения анализа опытным лаборантом.

**В основе метода SCD (sperm chromatin dispersion test, исследование дисперсии хроматина сперматозоидов)** лежит следующее различие: сперма с фрагментированной ДНК после проведения кислотной денатурации и удаления ядерных протеинов не образует характерный венчик рассеянных петель ДНК, который наблюдается в сперме с нативной ДНК. Это недорогой и простой в исполнении метод; основным его недостатком считают необходимость специальной подготовки лаборанта.

## 10.2 Современные подходы к коррекции повышенного уровня фрагментации ДНК сперматозоидов

Для снижения индекса ФДС необходимо выявить и устранить влияние всех неблагоприятных факторов.

**Курение.** Известно, что сперматозоиды высокочувствительны к АФК, а табак содержит несколько опасных соединений, из-за чего курение увеличивает концентрацию АФК в клетках. Прямая корреляция выраженности окислительного стресса с уровнем ФДС продемонстрирована во многих исследованиях. Другие вещества в составе сигарет, такие как кадмий и свинец, также могут вызвать повреждение ДНК. Никотин вызывает разрывы ДНК спермы, а котинин, который является его главным метаболитом, обнаружен в семенной жидкости курильщиков. Известно также, что курение нарушает функцию гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси.

**Алкоголь.** Употребление алкоголя ассоциировано с более низкими значениями следующих параметров репродуктивной функции мужчин: объема эякулята, концентрации сперматозоидов, количества подвижных форм и сперматозоидов с нормальной морфологией, вплоть до развития азооспермии при употреблении больших доз алкоголя. Отрицательное воздействие изменяет метаболизм тестостерона и эстрадиола. Кроме того, прослежена взаимосвязь уровня употребления алкоголя и уровня окислительного стресса. Опубликованы сведения об отрицательном влиянии алкоголя на уровень ФДС как у экспериментальных животных (крыс), так и у человека. Изменения эякулята, вызванные алкоголем, могут быть обратимыми и регрессировать после прекращения его употребления.

**Срок полового воздержания.** Уменьшение длительности полового воздержания с 3–7 дней до 1 дня статистически значимо снижает уровень ФДС у мужчин с бесплодием, что связывают с сокращением срока нахождения сперматозоидов в придатке яичка и ослаблением действия неблагоприятных факторов.

**Нарушения сна.** Нарушения сна, связанные с уменьшением его продолжительности из-за высокой нагрузки на работе и дома, со сменным характером работы, потенцируют снижение уровня тестостерона. Отрицательно влияют на уровень ФДС и гипоксия, развивающаяся при апноэ во сне, и усиление системного воспаления. По некоторым данным, повышение уровня ФДС статистически значимо связано с нерегулярным сном. Авторы объясняют этот факт нарушением продукции мелатонина.

**Условия работы, факторы окружающей среды.** Эндокринные дисрапторы, такие как бисфенол А, парабены, синтетические пиретроиды, пестициды и фталаты, попадают в организм человека с загрязненной пищей и водой, при контакте с кожей, дыхании, передаются через плаценту и грудное молоко. Основной механизм действия эндокринных дисрапторов заключается в имитации эндогенных гормонов и конкуренции с ними за связывание с их рецепторами или за воздействие на сигнальные внутриклеточные пути. Выявлены различные эффекты эндогенных дисрапторов, такие как эстрогенный, антиандрогенный и тиреоидоподобный, прямо или косвенно влияющие на продукцию стероидных гормонов, в том числе андрогенов. Опубликованы данные о неблагоприятном воздействии эндокринных дисрапторов на параметры эякулята, в том числе на уровень ФДС.

**Стресс.** Средний и высокий уровень профессионального стресса повышает индекс ФДС, тогда как уровень семейного (жизненного) стресса не оказывает статистически значимого влияния. В качестве возможных механизмов описано усиление апоптоза и некроза сперматозоидов. В экспериментах на животных установлено воздействие психогенного стресса на течение дегенеративных процессов в семенниках, апоптоз клеток семенных канальцев, некроспермию, количество aberrантных делений половых клеток сперматогенного эпителия и количество гамет с фрагментированной ДНК; отмечена тенденция к изменению продукции тестостерона и росту доимплантационных потерь.

**Ожирение.** Из-за выработки жировой тканью провоспалительных цитокинов усиливает системный окислительный стресс, индуцирует митохондриальную дисфункцию герминогенного эпителия, усугубляя нарушения сперматогенеза. Отрицательное влияние избыточной жировой ткани посредством действия лептина, грелина и резистина проявляется в снижении уровня общего тестостерона и глобулина, связывающего половые гормоны. Возникающий дефицит андрогенов способствует развитию инсулинорезистентности, также усиливающей системный окислительный стресс. Степень выраженности ожирения имеет положительную корреляцию с уровнем ФДС.

**Хронические заболевания.** Гормональные нарушения и соматические заболевания, например сахарный диабет и вирусный гепатит, могут повышать уровень ФДС. В качестве ключевого механизма чаще всего описывают усиление окислительного стресса и нарушение работы гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси.

**Инфекции репродуктивного тракта.** Наличие инфекций репродуктивного тракта может усиливать ФДС. Опубликованы данные о неблагоприятном влиянии *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium*, реализующемся посредством активации окислительного стресса и усиления апоптоза сперматозоидов.

**Варикоцеле.** Точный патофизиологический механизм, посредством которого варикоцеле влияет на сперматогенез и уровень ФДС, неизвестен, но в одном из метаанализов авторы указывают на увеличение скротальной температуры, отток крови от семенной вены и нарушение микроциркуляции. Продемонстрировано также увеличение содержания АФК и маркеров апоптоза в сперме бесплодных мужчин с варикоцеле. Однако следует иметь в виду, что увеличение уровня АФК и маркеров апоптоза часто наблюдается и в сперме бесплодных мужчин без варикоцеле. Антиоксиданты. Поскольку окислительный стресс является одним из важных механизмов формирования ФДС, использование антиоксидантов может снизить уровень ФДС, что демонстрируют результаты как иностранных, так и отечественных исследований. Невысокая стоимость и относительно низкий риск токсичности антиоксидантов делают их привлекательными для пациентов и врачей, поэтому они рекомендованы EAU для лечения мужского бесплодия, однако четкие рекомендации в отношении использования у пациентов с идиопатическим бесплодием пока отсутствуют.

В развитии нормальных эмбрионов играет большую роль ДНК сперматозоида, поскольку генетическая информация, передаваемая следующему поколению, зависит от ее целостности. Ввиду неблагоприятного влияния высокого уровня ФДС на вынашивание беременности и частоту выкидышей, необходимо своевременное определение индекса ФДС и его коррекция такими методами, как изменение образа жизни, медикаментозная терапия и, в особых случаях, применение тестискулярных сперматозоидов в лечебных циклах ВРТ (ЭКО + ICSI).

## **Заключение**

Бесплодный брак является следствием совокупных причин, приводящих к нарушению фертильности женщины, мужчины или сочетания обоих факторов. Роль мужской инфертильности в бесплодном браке на сегодняшний день составляет около 50%. При этом наблюдения указывают на прогрессирующее ухудшение качества спермы за последние десятилетия.

С учетом неблагоприятной демографической ситуации в стране, роль специалиста, занимающегося вопросами мужского здоровья, в том числе репродуктивного, становится все более значимой.

Сперматогенез - сложный, многоэтапный процесс, контролируемый эндокринной, иммунной, медиаторной и другими системами организма. Многогранность процесса определяет сложности диагностики нарушения фертильности. Эффективность лечения напрямую зависит от правильности установления диагноза и, соответственно, патогенетически обоснованной коррекции в каждом конкретном случае.

В предлагаемом учебном пособии представлены современные данные о классификации мужского бесплодия, этиологических факторах и диагностических инструментах, рекомендованных к использованию Всемирной организацией здравоохранения.

Теоретическая составляющая отражает стандарты диагностики при мужском бесплодии, генетические аспекты репродуктивных нарушений, необходимость использования методов вспомогательных репродуктивных технологий при тяжелых нарушениях сперматогенеза.

Основной задачей представленной в пособии информации является оптимизация лечебно-диагностических манипуляций при обследовании мужчины с нарушенной репродуктивной функцией в практике врачей-урологов, гинекологов, что позволит повысить эффективность программ по преодолению бесплодного брака.

## Список литературы

1. Алексеев, В. В. Медицинские лабораторные технологии : руководство по клинической лабораторной диагностике : в 2 т. Т. 1 / [В. В. Алексеев и др. ] ; под ред. А. И. Карпищенко. - 3-е изд. , перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 472 с. URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970422748.html>
2. World Health Organization, HRP WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Sixth edition. - 2021. - 276 с. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>
3. Епанчинцева Е.А., Селятицкая В.Г., Божедомов В.А. Индекс фрагментации ДНК сперматозоидов – необходимость для современной клинической практики. Андрология и генитальная хирургия 2020;21(1):14–21. <https://cyberleninka.ru/article/n/indeks-fragmentatsii-dnk-spermatozoidov-neobhodimost-dlya-sovremennoy-klinicheskoy-praktiki/viewer>
4. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Barcelona 2019. [https://vk.com/doc393178770\\_648364777?hash=7RZZSu8hJqnTzfbJq8jZbpXCzha595oE2dNYi6FZAp0&dl=YJjpCYOtVRvzlw6lvB0ZI4E5alfDIUWGpGmb6aTYRKD](https://vk.com/doc393178770_648364777?hash=7RZZSu8hJqnTzfbJq8jZbpXCzha595oE2dNYi6FZAp0&dl=YJjpCYOtVRvzlw6lvB0ZI4E5alfDIUWGpGmb6aTYRKD)
5. Соловьев, А. Е. Клиническая андрология : руководство для врачей / А. Е. Соловьев, Е. И. Карпов. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2023. - 200 с. URL: <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970473979.html>
6. Аляев, Ю. Г. Урология. Российские клинические рекомендации / под ред. Ю. Г. Аляева, П. В. Глыбочко, Д. Ю. Пушкаря - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 480 с. URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970431269.html>