

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КРАСНОЯРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. В. Ф. ВОЙНО-
ЯСЕНЕЦКОГО» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

РЕФЕРАТ

Тема: «Лабораторное исследование семенной жидкости»

Выполнила: врач-ординатор
Клинической лабораторной диагностики
Малкова Т.С.

Красноярск - 2020г.

Содержание:

1. Общее представление о семенной жидкости (сперме) и сперматогенезе.
2. Преаналитический этап исследования семенной жидкости.
3. Макроскопическое исследование эякулята.
4. Микроскопическое исследование эякулята. Клиническое значение отдельных показателей.
5. Биохимические и иммунологические исследования эякулята.
6. Общеклиническое исследование секрета предстательной железы.
7. Список литературы.

Сперма (эякулят) представляет собой взвесь сперматозоидов в секрете яичек и их придатков, которая к моменту эякуляции смешивается с секретом предстательной железы, отделяемого придатков, семенных пузырьков и бульбо-уретральных желез.

Сперма состоит из сперматозоидов, взвешенных в жидкой фазе. Сперматозоиды составляют около 5% объема спермы, они образуются в яичках. Примерно 60% объема спермы образуется в семенных пузырьках. Это вязкая, нейтральная, или слегка щелочная жидкость, часто желтая или даже сильно пигментированная из-за высокого содержания рибофлавина. Предстательная железа производит около 20% объема семенной жидкости. Эта жидкость, похожая на молоко, имеет слабокислую реакцию (pH около 6,5), в основном из-за высокого содержания лимонной кислоты. Простатический секрет также богат кислой фосфатазой и протеолитическими ферментами. Считается, что протеолитические ферменты отвечают за коагуляцию и разжижение семенной жидкости. Менее 10 — 15% объема спермы образуется в придатках яичек, семявыносящих протоках, бульбоуретральных и уретральных железах.

Сперматогенез

Сперматогенез происходит в яичках. В сперматогенезе принимают участие расположенные в канальцах яичек (гонад) клетки Лейдига, клетки Сертоли и сперматогенный эпителий. Сперматогенез включает несколько этапов превращения стволовой клетки в сперматозоид. В спермальном эпителии выделяют 2 типа сперматогоний: тип А и тип В. В типе А сперматогоний по функциональным и цитологическим признакам выделяют темные (dark) типа А (Ad) и бледные (pale) типа А (Ap) сперматогонии. Светлые сперматогонии типа А проявляют пролиферативную активность в обычных условиях. Это, очевидно, стволовые клетки. Темные сперматогонии (Ad) - резервные, которые переходят в состояние митоза, когда количество сперматогоний снижается, в частности после радиационного облучения. Светлые сперматогонии типа А делятся митозом на 2 клетки, давая начало популяции В-сперматогоний и запуская гаметогенез в яичках. Из В-сперматогоний формируются гаметы, имеющие тетраплоидный набор хромосом и называемые сперматоцитами I порядка.

В процессе развития сперматоцитов I порядка происходит интенсивный синтез РНК и миграция их в наружный слой семенных канальцев. Критическим в процессе гаметогенеза является мейоз сперматоцитов с образованием сначала сперматоцитов II порядка (диплоиды), а затем сперматид, имеющих гаплоидный набор хромосом.

Сперматозоиды из семенных протоков, смешиваясь с секретом клеток Сертоли, выходят через тубулярное сплетение в тестикулярные эфферентные протоки. 12-18 эфферентных протоков, каждый по 0,2-0,5 м длиной, формируют эпидидимис. В протоках эпидидимиса сперма находится от 2 до 11 дней. Эфферентные протоки выстланы многослойным переходным эпителием, который сорбирует ионы и воду из протоков в интерстиций. В подэпителиальном слое протоков имеется популяция тканевых макрофагов и лимфоцитов. Макрофаги фагоцитируют цитоплазматические капли, "сброшенные" с шейки созревших сперматозоидов, а при застое спермы макрофаги и эпителиальные клетки

количеству нейтрофилов. Окраска появляется постепенно в течение 2 мин наблюдения. В зависимости от количества нейтрофилов, которое при лейко- и гиоспермии значительно превышает 1000/мкл, отмечается более яркая окраска по сравнению с максимальной окраской этой зоны шкалы контейнера. Окраска появляется сразу после нанесения патологической спермы на диагностическую зону.

Билирубин

При желтухе, механической или инфекционной, сперма окрашивается в различные оттенки желтого цвета. Для дифференциальной диагностики от гиоспермии и от желтой окраски, обусловленной флавином, некоторыми витаминами и длительным половым воздержанием, используется диагностическая зона на билирубин, в которую заложена диазореакция Эрлиха. Это качественная реакция, которая оценивается в крестах, в зависимости от количества билирубина в исследуемом материале.

Реакция (pH)

Реакция спермы в норме слабощелочная или щелочная, pH колеблется в диапазоне 7,2-8,0. Определяют pH сразу после разжижения спермы. Щелочную реакцию сперме придает секрет бульбоуретральных желез. Относительную стабильность pH семенной жидкости создают фосфаты и карбонаты, выделяемые семенными пузырьками. Постоянная pH среды обеспечивает активную подвижность сперматозоидов. При наличии большого количества сперматозоидов pH снижается из-за интенсивного фруктолиза, сопровождающегося накоплением *in vitro* молочной кислоты. Резкощелочная реакция спермы (pH 9,0-10,0) свидетельствует о патологии предстательной железы. При закупорке семявыносящих протоков обоих семенных пузырьков или двустороннем врожденном отсутствии семявыносящих протоков на фоне азооспермии отмечается кислая реакция спермы (pH 6,0-6,8). Оплодотворяющая способность такой спермы отсутствует. Если pH семенной жидкости становится меньше 6,0, сперматозоиды уже *in vivo*, в семявыносящих протоках полностью теряют подвижность и погибают (некрозооспермия).

Низкие значения pH (меньше 7,2) некоторые авторы связывают с хроническим воспалительным процессом. Некоторые исследователи объясняют сдвиг pH в щелочную сторону (более 8,0) острым воспалительным процессом придаточных желез (острый простатит, везикулит, билатеральный эпидидимит).

Для определения pH спермы можно использовать универсальную индикаторную бумагу. Полоску индикаторной бумаги следует обмокнуть в сперму или нанести каплю исследуемой спермы с помощью пипетки, положить на белую непромокаемую подложку. Цвет реактивной зоны полоски быстро сравнить с эталонной шкалой. Цвет отдельных квадратов шкалы соответствует значениям pH от 1 до 12 с интервалом 1 единица pH. Если цвет реактивной зоны оказывается между двумя цветными квадратами, то результаты могут быть интерполированы к целым значениям или к промежуточным значениям с диапазоном 0,5 единицы. Однако более удобно использовать диагностическую зону для определения pH, входящую в любой политест для исследования мочи, в котором есть диагностические зоны на кровь, лейкоциты, билирубин.

По-видимому, можно использовать для исследования спермы больных с урогенитальными инфекциями диагностическую зону на нитриты для подтверждения наличия продуктов жизнедеятельности бактерий, вызвавших воспалительный процесс в мужской половой сфере.

Микроскопическое исследование

Микроскопическое исследование эякулята проводится после полного его разжижения. Оно включает в себя:

- обнаружение в нативном препарате сперматозоидов, определение характера их движения (кинезиограмма), присутствие "круглых клеток", агглютинации, агрегации сперматозоидов, кристаллов спермина, слизи;

обеспечивающим минимальные изменения получаемых показателей. Для первичной оценки эякулята следует провести 2 исследования с интервалом не менее 7 дней и не более 3 недель. Если результаты 2 исследований значительно отличаются друг от друга, нужно провести дополнительный анализ, так как результаты у одного пациента могут существенно варьировать.

Сперму желательно получить непосредственно в лаборатории в стерильный одноразовый пластиковый контейнер для биопроб с герметично закрывающейся крышкой методом мастурбации, что позволяет получить весь секрет в чистом виде. В сперме, собранной в презерватив, сперматозоиды быстро теряют свою подвижность, непищевая пластиковая посуда также может обладать токсическим эффектом и создавать условия для обездвиживания и гибели сперматозоидов. На этикетке указываются имя и фамилия пациента, дата и время получения эякулята, срок полового воздержания.

Хранить сперму следует в термостате при $+37^{\circ}\text{C}$, чтобы избежать отрицательного воздействия холода на подвижность сперматозоидов. Если по каким-то причинам сперму пациент может собрать только дома, то в лабораторию ее необходимо доставить в течение 1 ч, не охлаждая ниже $+20^{\circ}\text{C}$.

Для бактериологического исследования пациент должен предварительно помочиться, затем вымыть руки, половой член и собрать эякулят в стерильный пластиковый контейнер для биопроб.

Результаты макроскопического, химического и микроскопического анализа эякулята, время и место получения спермы заносятся в бланк.

Образцы эякулята могут содержать возбудителей опасных инфекций (вирусы СПИДа, герпеса, гепатита), поэтому работа с ними требует предельной осторожности, а используемые в работе расходные материалы должны быть одноразовыми и подлежать утилизации (сжигание в автоклаве при $+132-134^{\circ}\text{C}$).

Макроскопическое исследование

Консистенция

Сперма, полученная при эякуляции, густая и вязкая, что обусловлено свертыванием секрета семенных пузырьков. Под влиянием ферментов предстательной железы (гиалуронидазы, фибринолизина и фиброкиназы, активированных лимонной кислотой, через 8 — 25 минут наступает полное разжижение эякулята.

Разжижение спермы определяют по изменению ее вязкости. Эякулят, набранный в шприц выпускают из него через специальную иглу. Вязкость измеряют по длине «нити», тянущейся за выпущенной каплей. Сперма считается разжиженной, если длина «нити» не более 2 см. Нормальная сперма разжижается в течение 10 — 40 минут. Если эякулят длительное время остается вязким, полувязким или вообще не разжижается, можно думать о нарушении функций предстательной железы. Вязкая консистенция спермы препятствует движению сперматозоидов, которые или не двигаются, или быстро теряют подвижность. Понижение вязкости часто сопутствует азооспермии, аспермии или олигоспермии.

Объем

Объем эякулята — один из важнейших изучаемых параметров спермограммы. Вместе с концентрацией сперматозоидов этот показатель дает представление об их общем количестве, извергаемом при половом акте. В норме объем эякулята составляет 2 — 6 мл. Количество менее 2,0 мл может рассматриваться как одна из причин мужского бесплодия (олигоспермия), оно характерно для андрогенной недостаточности, других эндокринных заболеваний, сужения и деформации пузырьков, семявыводящих путей. При малом объеме эякулята (даже при нормальном количестве сперматозоидов) существует угроза для нормального зачатия. Это связано с тем, что при семяизвержении во влагалище сперматозоиды оказываются в агрессивной кислой среде, где погибают через 2 — 3 часа. За это время наиболее подвижные и здоровые из них попадают в полость матки и фаллопиевы

Количество лейкоцитов, эритроцитов, число лецитиновых зерен, амилоидных телеч выражают в среднем на одно поле зрения. Если имеется необходимость, то все перечисленные элементы эякулята можно подсчитать, как подсчитывают сперматозоиды в камере Горяева. Этот прием позволяет следить за эффективностью лечения воспалительных заболеваний дополнительных половых желез.

Обращают внимание на скопление сперматозоидов, если таковые имеются. Возможно хаотическое скопление или патологическая агглютинация (сперматозоиды склеены головками или хвостами).

Высчитывают процент агглютинированных сперматозоидов. Для этого густую каплю спермы оставляют на предметном столе на 1 — 3 часа, после этого препарат фиксируют над пламенем горелки. Считают в окулярной сетке, рассчитывая процент склеенных сперматозоидов. В норме склеивается не более 3 — 5%. Если процент агглютинированных сперматозоидов составляет 10 — 15%, можно говорить о понижении их оплодотворяющей способности.

В норме у практически здоровых пациентов агглютинации сперматозоидов нет. Агглютинация позволяет предположить наличие иммунологического фактора бесплодия, однако ее нельзя считать доказательством последнего. В бланке отмечается тип агглютинации (головками, хвостами или смешанный вариант) и оценивается степень агглютинации полуколичественно:

- "—" - отсутствие агглютинации;
- "+" - слабо выраженная - в нативном препарате до 10 кучек сперматозоидов по 4-6 в каждой;
- "---" - значительная агглютинация - в препарате более 20 кучек сперматозоидов по 4-8 в каждой;
- "+++" - резко выраженная - в препарате более 20 кучек, в каждой более 20 сперматозоидов;
- "++++" - тяжелая степень - все подвижные сперматозоиды находятся в состоянии агглютинации.

Агрегация

Агрегация (псевдоагглютинация) — хаотическое скопление неподвижных, сперматозоидов, нагромождение их на комочки или тяжи слизи, клеточные элементы и детрит. Агрегация и агглютинация оцениваются как отдельные показатели.

Слизь

Слизь в нормальном эякуляте отсутствует. Обнаруживается слизь при воспалении уретры, 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 нативном и окрашенном азур-эозином препаратах определяется по обнаруженным и заключенным в ней эпителиальным клеткам и другим клеточным элементам. Слизь, в каком бы виде она не присутствовала в сперме, препятствует движению сперматозоидов и приводит к снижению фертильности (оплодотворяющей способности спермы).

Липоидные и амилоидные тельца

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

Липоидные тельца — это мелкие блестящие зернышки, содержащиеся в нормальной сперме в большом количестве. При простатите их количество уменьшается, а при длительном воспалении липоидные тельца исчезают из спермы.

Амилоидные тельца (конкременты) — образования округлой формы, разных размеров, серого или желтоватого цвета с характерной слоистостью, напоминающей спил дерева.

меньше период полового воздержания, тем меньше неподвижных клеток. Много содержится быстрых, прямолинейно движущихся сперматозоидов категории А (40 — 60%) — это вторые, молодые, недавно сформировавшиеся в яичках спермии. Непрогрессивно подвижных клеток категории В — примерно 10 — 15% с нарушениями строения шейки и жгутика, либо «стареющих». Меньше всего сперматозоидов категории С (5 — 15%).

В нормальной фертильной сперме прогрессивно подвижных (А + В) должно быть не менее половины, либо быстрых прогрессивно подвижных (А) — не менее четверти.

Согласно принятым критериям количество сперматозоидов с нормальной подвижностью составляет более 50%, малоподвижных с поступательным движением — менее 50%, с непоступательным движением — 2%, неподвижные — отсутствуют.

На подвижность сперматозоидов влияет температура: при 37 °С скорость максимальна, при комнатной температуре она снижается, а при 10 °С сперматозоиды неподвижны.

Для более объективной оценки степени подвижности сперматозоидов микроскоп оснащают термостатируемым предметным столиком для установления температуры 37 °С.

Методика определения подвижности с подсчетом в камере Горяева. Сперму разводят в 20 раз физиологическим раствором, в камере смотрят только неподвижные и малоподвижные сперматозоиды.

Расчет производят по формуле

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

где А — общее количество сперматозоидов из предыдущей методики; В — количество малоподвижных сперматозоидов; С — количество неподвижных сперматозоидов

Отсюда процент активно-подвижных сперматозоидов составляет (Y):

$$Y = (X \times 100) / A,$$

где А — 100%; X — Y%.

Подсчет подвижных сперматозоидов можно также проводить и через 3, 6, 24 ч. Этот прием важен для оценки оплодотворяющей способности сперматозоидов. Для динамического наблюдения сперматозоидов можно использовать метод «висячей капли», при этом сперму хранят в течение всего времени в термостате. При наличии патологического процесса подвижность через 6 ч составляет 0 — 20%, через 12 ч — 0 — 3%.

Физиологические колебания подвижности

Подвижность сперматозоидов зависит от времени года и суток. Имеются сообщения, что весной происходит снижение подвижности сперматозоидов (сезонные колебания). При наблюдении за количеством активно-подвижных сперматозоидов в течение суток было отмечено увеличение их количества во второй половине дня (суточные ритмы). Была также прослежена зависимость подвижности сперматозоидов от частоты эякуляции. У пациентов с олиго- и астенозооспермией при эякуляции каждые 4-6 часов отмечалось относительное увеличение количества активно-подвижных сперматозоидов.

Астенозооспермия

Астенозооспермия — снижение подвижности сперматозоидов ниже нормы. Астенозооспермия отмечается примерно у 50% пациентов с нарушением фертильности. Заключение о незначительной степени астенозооспермии можно делать, если количество активно- и малоподвижных сперматозоидов с поступательным движением в сумме составляет менее 50%, но более 30%.

Астенозооспермию вызывают эндогенные, генетические и экзогенные факторы, такие, как инфекционные заболевания.

Причины астенозооспермии:

- Генетически обусловленные нарушения строения жгутика.
- Энергетические нарушения, связанные с генетически обусловленными или функциональными дефектами митохондрий.

Если сперматозоиды единичные в поле зрения в нативном препарате, аналогично закладывают камеру Горяева и подсчитывают в 100 больших квадратах (как лейкоциты).

Расчет производят по формуле

$$X = A \times 2500$$

Общее количество сперматозоидов в эякуляте рассчитывают, умножая количество сперматозоидов в 1 мл спермы на объем выделенной спермы.

Олигозооспермия — уменьшение количества сперматозоидов в эякуляте. В настоящее время нижняя граница нормы, по данным ВОЗ, составляет 20 млн сперматозоидов в 1 мл эякулята. Для определения истинного числа сперматозоидов при олигоспермии необходимо произвести 2 — 3 контрольных подсчета с интервалом в 3 — 4 недели. У одного и того же мужчины число сперматозоидов подвержено большим физиологическим колебаниям.

Азооспермия — отсутствие сперматозоидов в эякуляте при наличии предшествующих им клеток сперматогенеза, продуктов секреции предстательной железы и семенных пузырьков.

Аспермия — отсутствие в семенной жидкости сперматозоидов и клеток сперматогенеза. При этом во время полового акта сохраняется способность выделения эякулята, состоящего из секрета предстательной железы и семенных пузырьков.

Полизооспермия — увеличение количества сперматозоидов в 1 мл эякулята более 150 млн.

Клинические аспекты уменьшения количества сперматозоидов в эякуляте.

Транзитная и старческая олигозооспермия

У одного и того же мужчины число сперматозоидов подвержено большим физиологическим колебаниям. У пожилых олигозооспермия связана с процессом инволюции половых желез и сочетается с олигоспермией (количество выделенной спермы меньше 2 мл).

Наследственная олигозооспермия и азооспермия истинная обусловлены полной или частичной обструкцией семявыносящих путей. Предположить наличие полной обструкции можно, если после центрифугирования спермы в осадке выделенной пациентом жидкости отсутствуют не только сперматозоиды, но и клетки сперматогенеза. Это признак не только азооспермии, но и аспермии. При непосредственном поражении яичек (гонад) возникает первичный гипогонадизм. Первичный врожденный гипогонадизм обусловлен наследственными генетическими аномалиями и врожденными дефектами развития:

1. недостаточность клеток Лейдига;
2. наследственные генетические аномалии: синдромы Клайнфельтера и Шерешевского-Тернера, хромосомные aberrации, мутации AZF области Y (синдром "только клетки Сертоли"), наследственные синдромы с нормальным кариотипом (синдром Нунена), низкая чувствительность к андрогенам;
3. врожденная азооспермия может быть обусловлена отсутствием vas deferens. Эякулят у таких пациентов не содержит сперматозоидов и клеток сперматогенеза, а pH — ниже 7.0 (кислая реакция). Такая патология отмечается у пациентов, страдающих муковисцидозом, причем у этих пациентов также может быть обнаружена атрезия эпидидимиса и семенных пузырьков.

Приобретенная олигозооспермия, азооспермия и аспермия могут быть обусловлены обструкцией семявыносящих путей, развивающейся на фоне хронических воспалительных процессов верхних отделов мочеполового тракта, вызванных гонококками, хламидиями, микобактериями туберкулеза.

Тестикулярная дисфункция может привести к нарушению сперматогенеза. При нарушении гипоталамо-гипофизарной регуляции сперматогенеза развивается вторичный гипогонадизм.

Размеры цитоплазматических капель, если они есть, не должны превышать $1/3$ головки сперматозоида (цитоплазматическая капля — остаток цитоплазмы сперматиды). Хвост должен быть прямым, одинаковой толщины на всем протяжении и несколько уже в средней части, не закрученным и иметь длину около 45 мкм. Отношение длины головки к длине хвоста у нормальных сперматозоидов 1:9 или 1:10.

Патологические формы сперматозоидов

Патологические формы сперматозоидов в эякуляте показаны на рис. 170 и на микрофотографиях (рис. 171-198. Иммерсия, $\times 1000$).

Дефекты головки: головки большие, маленькие, конические, грушевидные, круглые, аморфные, с вакуолями в области хроматина; головки с маленькой акросомальной областью (меньше 40% площади головки), вакуолизированной акросомой, с несимметрично расположенной акросомой; двойные и множественные головки, головки с компактным строением хроматина в виде ядра 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: хвосты короткие, множественные, в виде пиньки, сломанные, наклонные (угол больше 90°), неравномерная толщина хвоста, тонкая средняя часть, закрученный кончик, закрученный полностью и их любая комбинация.

Цитоплазматическая капля, если она есть, в норме не должна быть более $1/3$ головки 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.

Сперматозоиды с резко выраженными патологическими признаками достаточно хорошо видны в нативном препарате при увеличении $\times 400$ (монокулярный микроскоп с окуляром $\times 10$ или бинокулярный микроскоп с окулярами $\times 7$ или $\times 0$ и объективом $\times 40$).

Иногда большое число сперматозоидов может иметь структурный специфический дефект — отсутствие акросомы. Для этих сперматозоидов характерны маленькие круглые головки, хорошо видимые в нативных препаратах. Такое состояние носит название глобозооспермия.

Непрочная связь головки с хвостом в области базальной пластинки приводит к отделению головки от хвоста. Головки фагоцитируются клетками Сертоли, и в эякуляте можно обнаружить только отделенные хвосты или так называемые "булавочные головки".

Более точная диагностика патологических форм сперматозоидов производится в препаратах, окрашенных азур-эозином вручную, по Нохту, Романовскому-Гимзе, Паппенгейму или на автоматах для окраски мазков типа "Тема-Тек" или ПОМК-01, с последующей микроскопией на иммерсии ($\times 900-1000$).

Тератозооспермия

Тератозооспермия — увеличение количества патологических форм сперматозоидов выше референтных значений. Выраженная тератозооспермия резко снижает шансы оплодотворения и увеличивает вероятность пороков развития у плода, если оплодотворение произошло. Тератозооспермия обычно сочетается с олигозооспермией и астенозооспермией.

В нативном препарате ($\times 400$) относительно хорошо видны практически 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

Подсчет индексов множественных дефектов сперматозоидов

Сперматозоиды с патологической морфологией часто имеют множественные дефекты. Ранее в протоколах фиксировалось только 1 дефект, предпочтение отдавалось дефектам головки. В настоящее время часто подсчитывают индекс тератозооспермии (ИТЗ) или индекс множественных аномалий (ИМА), то есть число дефектов, деленное на число патологических сперматозоидов. С помощью этих индексов прогнозируется функция сперматозоидов как *in vivo* (ЭКО), так и *in vitro* (фертильность эякулята). Для подсчета этого индекса можно использовать клавишные счетчики клеток крови. Отдельно выделяют "дефекты головки", "дефекты средней части", "дефекты хвоста". Значение ИТЗ лежит в пределах от 1,00 (каждый патологический сперматозоид имеет только 1 дефект) до 3,00 (каждый патологический сперматозоид имеет дефекты головки, средней части и хвоста). Имеются данные, что при ИТЗ более 1,6 происходит снижение частоты наступления беременности.

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 точности 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 (синдром Картегенера).

Если количество неподвижных сперматозоидов в нативном препарате превышает 50% или все сперматозоиды неподвижные, необходимо решить, что произошло со сперматозоидами – акинозооспермия или некрозооспермия.

Акинозооспермия - временная неподвижность сперматозоидов, возникшая в процессе транспортировки спермы. Оживляющими процедурами их можно заставить двигаться.

Процедура оживления неподвижных сперматозоидов

Первая процедура, "оживляющая" неподвижных сперматозоидов, - слабое подорезание нативного препарата. Если эта процедура не помогла, необходимо провести процедуру "оживления" с любыми двумя "оживляющими" растворами. В качестве "оживляющих" можно использовать следующие растворы:

1. раствор Беккера: глюкоза - 3 г, KH_2PO_4 - 0,6 г, NaCl - 0,2 г; KH_2PO_4 - 0,01 г; дистиллированная вода - до 100 мл (pH 7,8);
2. 0,1 % раствор кофеина (ампульным кофеином пользоваться нельзя);
3. 0,1 M раствор аргинина;
4. раствор Рингера;
5. изотонический раствор глюкозы.

Процедура "оживления": 0,1 мл хорошо размешанной спермы смешать с 0,9 мл любой "оживляющей" жидкости путем многократного пипетирования. В приготовленном нативном препарате при наблюдении за ним под большим увеличением микроскопа через 5-10 минут неподвижные, но живые сперматозоиды начинают двигаться. В этом препарате следует подсчитать кинезиограмму.

Если после проведения "оживляющих" процедур сперматозоиды остались неподвижными, необходимо оценить их жизнеспособность. Известно, что живые клетки не воспринимают суправитальной окраски, а мертвые окрашиваются в цвет красителя.

Неподвижность сперматозоидов может быть связана с патологией хвоста генетически обусловленный дефект строения акронемы - синдром Картегенера; сперматозоиды живые, но не могут двигаться). Присутствие в эякуляте мертвых сперматозоидов свидетельствует о некрозооспермии, наступившей *in vivo* или *in vitro*.

Дифференциальная диагностика живых и мертвых сперматозоидов

Оценка исследования. Результат ИОС-теста считают нормальным, если набухание хвоста выявлено более чем у 60% сперматозоидов. Образец эякулята считается патологическим при набухании хвоста менее чем у 50% сперматозоидов.

Перед проведением ИОС-теста предварительно исследуют эякулят на наличие сперматозоидов с «закрученными» хвостами и определяют их содержание в процентах. Для подсчета истинного количества сперматозоидов, подвергшихся воздействию при ИОС-тесте, от процентного содержания измененных при проведении ИОС-теста сперматозоидов отнимают процентное содержание сперматозоидов с закрученными хвостами.

Другие клетки эякулята.

Другие клетки эякулята, кроме сперматозоидов, в совокупности обозначают, как «круглые клетки». Их количество не должно превышать $5 \cdot 10^6$ /мл спермы. Морфология незрелых половых клеток, нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, эпителия, эритроцитов хорошо видна в нативных препаратах и в камере Горяева при увеличении $\times 400$. Однако при исследовании нативного препарата с иммерсионным объективом ($\times 90$ или $\times 100$) морфологические особенности клеточных элементов видны более четко.

Лейкоциты

Эякулят здорового мужчины содержит лейкоциты. Это нейтрофилы, количество которых не должно превышать $1 \cdot 10^6$ /мл. Повышенное количество лейкоцитов носит название лейкоспермия. Если содержание лейкоцитов изменяет белый цвет спермы на желтовато-зеленоватый, можно говорить о пиоспермии.

В нативном препарате эякулята при увеличении $\times 400$ нейтрофилы — это круглые, сероватые, мелкозернистые клетки диаметром 14-16 мкм. Диаметр нейтрофилов в сперме всегда несколько больше, чем в кислой моче, т. к. pH спермы обычно 7,5-8,0. Если pH спермы на верхней границе нормы или превышает ее, клетки разбухают еще больше. В этих клетках отмечается броуновское движение нейтрофильных гранул и хорошо видны сегментированные ядра, особенно на иммерсии ($\times 900$ или $\times 1000$). Для этого на покровное стекло нужно нанести каплю иммерсионного масла и перевести микроскоп на иммерсионный объектив ($\times 90$ или $\times 100$).

Общее количество лейкоцитов в эякуляте подсчитывается в камере Горяева при $\times 400$ после подсчета общего количества сперматозоидов. Лейкоциты считают в 100 больших квадратах. Расчет проводят по формуле:

$$L = \frac{a \times 250 \times 10 \times 100}{100}$$

где L — количество лейкоцитов в 1 мл эякулята, а — количество лейкоцитов в 100 больших квадратах, 250 — 1/250-объем одного большого квадрата, 10 — степень разведения спермы, 1000-1000 мкл в 1 мл эякулята.

Окончательный вариант формулы:

$$L = a \times 25\,000.$$

Если количество лейкоцитов большое, считают клетки в 40 больших квадратах (20 квадратов сверху сетки и 20 — внизу). Расчет проводят по формуле:

$$L = \frac{a \times 250 \times 10 \times 100}{40}$$

где а — количество лейкоцитов в 40 больших квадратах, 250 — 1/250-объем одного большого квадрата, 10 — степень разведения спермы, 1000-1000 мкл в 1 мл спермы, 40-количество больших квадратов.

Окончательный вариант формулы:

$$L = a \times 62\,500.$$

число клеток сперматогенеза меньше 3700 в 1 мл составляет наименьший лимит обнаружения этих клеток для образца объемом 1 мл.

Приготовление мазков

На обезжиренное предметное стекло нанести каплю аккуратно, без пены размешанной спермы или каплю осадка спермы, полученного после ее центрифугирования. С помощью палочкового шпателя или покровного стекла легким движением сделать мазок.

Мазки должны быть тонкими, равномерными, занимать не более 2/3 предметного стекла и заканчиваться точкой.

Для окраски препаратов, приготовленных из спермы, применяют унифицированные гематологические методы фиксации и окраски. Это окраска по Нохту или Романовскому-Гимзе с предварительной фиксацией мазков метиловым или этиловым спиртом; окраска по Паппенгейму-Крюкову с фиксацией мазков фиксатором-красителем типа Мая-Грюнвальда и последующей доокраской препаратов рабочими растворами краски Романовского-Гимзы или Нохта.

В окрашенных гематологическими красителями препаратах спермы четко прокрашиваются клетки сперматогенеза, остаточные тельца, плоский, переходный и цилиндрический эпителий, макрофаги, спермиофаги, лейкоциты, эритроциты, трихомонады. У сперматозоидов прокрашивается головка, видно распределение в ней хроматина и наличие или отсутствие акросомальной зоны, цитоплазматические капли на шейке и головке юных сперматозоидов ("космонавты"), шейка и хвост.

Морфология "круглых клеток" в препаратах спермы, окрашенных азур-эозином

В окрашенных препаратах встречаются клетки сперматогенеза (2 — 4%) на разных стадиях созревания: сперматогоний, сперматоцит I порядка, сперматоцит II порядка, сперматид.

Сперматогоний это неоднородная популяция, состоящая из клеток типа А и В, которые располагаются между клетками Сертоли на базальной мембране семенных канальцев и прикрыты сверху этими же клетками. 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 (стволовые клетки) зерна хроматина так распределены по ядру, что оно кажется в световом микроскопе бледно окрашенным. Хроматин темных клеток типа А также относится к деконденсированному типу, он недостаточно собран в глыбки, тем не менее его конденсация настолько выражена, что в препарате ядро окрашивается более интенсивно (темное). В ядрах вблизи оболочки светлых и темных сперматогоний всегда есть ядрышки. В сперматогониях типа В ядра более крупные, хроматиновой структуры. Эти клетки делятся и образуют сперматоциты первого порядка.

Сперматоциты I порядка так же как сперматогонии, в норме находятся в канальцах яичек, 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.

Сперматоцит II порядка — эти клетки также в норме находятся в канальцах яичек и появляются в сперме при нарушении спермиогенеза. Клетки круглой формы, диаметр которых в 2-3 раза превышает диаметр эритроцита, составляя 14-21 мкм. Ядро или два ядра округлой формы располагаются в клетке центрально, нити хроматина переплетаются между собой достаточно рыхло. Ядрышки не видны или видны нечетко. Цитоплазма базофильная,

лучи, видны хвосты частично заглоченных сперматозоидов. В норме в канальцах эпидидимуса роль макрофагов выполняют эпителиальные клетки (спермиофаги или эпидидимиса), которые фагоцитируют цитоплазматические капли, "сброшенные" с шейки созревших сперматозоидов. Появление в сперме спермиофагов обусловлено длительным застоем спермы в эпидидимисе и выходом из эпидидимуса неполноценных или старых сперматозоидов при редких эякуляциях.

Эритроциты. В нативных и окрашенных азур-эозином препаратах эритроциты выглядят так же, как и в любом другом биологическом материале. В нативных препаратах это правильной круглой формы бледно-желтые клетки с просветлением в центре, диаметром 7-9 мкм, лежащие разрозненно или скоплениями. При перемещении клеток с током жидкости видно, что эритроциты — это уплощенные, похожие на двояковогнутую линзу клетки. В препарате, окрашенном азур-эозином, эритроциты безъядерные клетки розовато-серого цвета. В сперме здоровых мужчин эритроцитов нет. Появление эритроцитов в эякуляте носит название гемоспермия. Гемоспермия может быть истинной и ложной.

Ложная гемоспермия — это появление эритроцитов в сперме в результате острой микротравмы (грубая мастурбация), получение спермы на следующий день после инструментального исследования мочевого пузыря или после взятия материала из уретры для бактериологического исследования).

Истинная гемоспермия наблюдается при воспалении добавочных желез и новообразованиях в яичках и простате.

Эпителий. Клетки многослойного плоского ороговевающего эпителия. В сперме здорового мужчины можно обнаружить единичные клетки ороговевшего поверхностного слоя многослойного эпителия, которые при эякуляции смываются с головки полового члена и крайней плоти. В нативном препарате 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 пикнотичным, гиперхромным ядром, диаметром 4-6 мкм. Цитоплазма этих клеток окрашена слабо, серовато-голубого или серого цвета.

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 бесцветной 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 часть уретры. Поверхностно расположенные клетки также могут отторгаться во время семяизвержения и выявляться в сперме. В нативном препарате это клетки вытянутой формы с расширенным апикальным и заостренным дистальным концом, заканчивающимся "хвостиком" (хвостатые клетки). Это клетки обычно находятся в состоянии дистрофии ядра и цитоплазмы. Дистрофия ядер в нативных препаратах не видна, а дистрофия цитоплазмы может быть вакуольной (округлые пустоты в цитоплазме), грубозернистой белковой или жировой (капли жира в цитоплазме).

Переходный (многослойный) эпителий. Начальные участки простатической части уретры, дистальные участки семяизвергающих каналов и простатических ходов выстланы многослойным переходным эпителием, поверхностные клетки которого также могут попасть в семяизвергающийся эякулят. Поверхностные клетки многослойного переходного эпителия в нативном препарате округлой и неправильной округлой формы ("помятые"). На большом увеличении микроскопа на фоне обильной цитоплазмы видны одно, два или три ядра. Цитоплазма этих клеток обычно находится в состоянии дистрофии: грубозернистой

Референтные значения результатов клинко-микроскопического исследования эякулята

Объем	2-6 мл
Разжижение	В течение 60 мин
pH	7,2-8,0
Концентрация сперматозоидов	20×10^6 мл и более
Общее количество сперматозоидов в эякуляте	40×10^6 и более
Подвижность	50% и более подвижных (категория а - б) или 25% и более с поступательным движением (категория а) в течение 60 мин после эякуляции
Морфология	$\geq 30\%$ нормальных сперматозоидов
Жизнеспособность	$\geq 75\%$ живых сперматозоидов, то есть не окрашенных при суправитальной окраске
Лейкоциты	$< 1 \times 10^6$ мл

БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЯКУЛЯТА

Изучение биохимического состава эякулята, наряду с исследованием его физиологических и морфологических свойств, является важным для понимания вопросов, связанных с физиологией и патологией сперматогенеза.

В состав семенной жидкости человека входит большое количество неорганических и органических веществ (углеводов, липидов, белков, свободных аминокислот, гормонов, витаминов, ферментов). От содержания этих компонентов в определенной мере зависит оплодотворяющая способность сперматозоидов. Однако до настоящего времени биохимический состав спермы и происходящие в ней процессы изучены недостаточно. Наибольшее практическое значение имеет определение фруктозы, фруктолиза и лимонной кислоты в эякуляте.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРУКТОЗЫ

Образование фруктозы происходит в семенных пузырьках. За счет расщепления фруктозы (фруктолиза) получается энергия, необходимая для жизненных процессов сперматозоидов.

Фруктоза образуется только при достаточной гормональной функции glanduloцитов. Потребление фруктозы зависит от числа сперматозоидов, их подвижности и способности к фруктолизу. Средняя концентрация фруктозы в эякуляте равна или превышает 14 ммоль/л. Значительное понижение содержания фруктозы (менее 7 ммоль/л) указывает на недостаток андрогенов.

Ход определения:

0,5 мл спермы тщательно смешивают с 7,5 мл дистиллированной воды, затем при помешивании прибавляют 1 мл 10% раствора цинка сульфата и 1 мл 0,5 н. раствора натрия гидроксида. Пробирку на 1 мин погружают в кипящую водяную баню для лучшей коагуляции белка, затем фильтруют. К 2 мл фильтрата прибавляют 2 мл 0,1% спиртового раствора резорцина и 6 мл 30% соляной кислоты. Ставят на 8 мин в водяную баню при температуре $+80^\circ \text{C}$.

Наступает стойкое окрашивание. Экстинкцию исследуемого раствора определяют в фотокалориметре при длине волны 250 нм в сравнении с контрольной пробой, которая вместо спермы содержит 0,5 мл дистиллированной воды. Количество фруктозы определяют от калибровочной кривой, составленной на основании анализа кристаллической фруктозы.

Лимонная кислота образуется в предстательной железе.

В норме концентрация лимонной кислоты в сперме может служить своеобразным "андрологическим эквивалентом" эндокринной функции яичек.

2. Количественное определение АСАТ методами ИФА, РИА, проточной цитометрией.
 3. Определение специфических компонентов антиген-антитело (иммуноблоттинг, хроматография с иммуноабсорпцией).
- Положительным считается результат обнаружения АСАТ в крови более 75 МЕ/мл.

Общеклиническое исследование секрета предстательной железы

Секрет предстательной железы получают после энергичного массажа предстательной железы.

МАКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Количество. Нормальное количество секрета колеблется от 3–4 мл до 1–2 капель.

Цвет. Жидкость беловатого цвета, густой, вязкой консистенции. При гнойных процессах в предстательной железе жидкость становится мутно-жёлтой, а примесь крови придаёт ей различные оттенки красного цвета.

Запах. В норме имеет характерный запах в связи с наличием особого соединения — спермина. Воспалительные и другие патологические процессы в предстательной железе придают различный запах секрету.

Реакция (pH). В норме pH слабокислая; при воспалительных процессах в предстательной железе pH сдвигается в кислую сторону.

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Лейкоциты. В нормальном секрете количество лейкоцитов составляет от 0 до 10–12 в поле зрения или до 2000 в 1 мл при подсчёте в камере. Количество их увеличивается при воспалительных процессах, однако на результаты влияет техника взятия материала и примесь содержимого уретры.

Эритроциты в нормальном секрете единичные; увеличенное количество выявляют при воспалительных процессах и новообразованиях.

Эпителиальные клетки. Выводные протоки предстательной железы выстланы цилиндрическим и переходным эпителием. В норме в секрете обнаруживают единичные клетки цилиндрического эпителия. Большое количество эпителиальных клеток, особенно в состоянии жирового перерождения и в сочетании с множеством лейкоцитов, свидетельствует о воспалительном процессе.

Макрофаги обнаруживают при хронических воспалительных процессах и при застое секрета. Гигантские клетки типа клеток инородных тел могут быть в тех же случаях, что и макрофаги.

Амлоидные конкременты (тельца) представляют собой сгущённый секрет железы, имеют овальную форму и слоистое строение, иногда неправильную форму. В норме отсутствуют. Их появление указывает на застой в простате, что может иметь место при воспалительных процессах, аденомах, у лиц пожилого возраста при гипертрофии железы.

Лецитиновые зёрна — специфический продукт секреции эпителия предстательной железы, придают секрету молочный вид, относятся к фосфатидам; нормальный секрет богат ими. Уменьшение их количества наряду с увеличением количества лейкоцитов наблюдают при злокачественных опухолях простаты, воспалительных процессах.

В секрете предстательной железы могут быть *тельца Труссо-Лаллемана* — напоминающие восковидные цилиндры, и *кристаллы Биттхера*, похожие на кристаллы Шарко-Лейдена. Появление их связывают с простатитами.

Клетки злокачественных новообразований. Эти клетки чаще обнаруживают в виде комплексов с фестончатыми краями, со стёртыми границами между клетками.

Элементы гриба находят при грибковом поражении простаты.

Ретенционный синдром (синдром застоя) наблюдают при аденоме железы; проявляется обилием макрофагов, наличием многоядерных клеток типа инородных тел и амлоид тел.