

Лабораторное руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека

Шестое издание



Всемирная организация
здравоохранения

human
reproduction
programme **hrp**
research for impact
UNDP · UNFPA · UNICEF · WHO · WORLD BANK

Лабораторное руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека

Шестое издание



Всемирная организация
здравоохранения

human
reproduction
programme **hrp**
research for impact
UNDP · UNFPA · UNICEF · WHO · WORLD BANK

Лабораторное руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека, шестое издание [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition]

ISBN 978-92-4-007411-8 (онлайн-версия)

ISBN 978-92-4-007412-5 (версия для печати)

© Всемирная организация здравоохранения, 2023 г.

Некоторые права защищены. Настоящая публикация распространяется на условиях лицензии Creative Commons 3.0 IGO «С указанием авторства – Некоммерческая – Распространение на тех же условиях» (CC BY-NC-SA 3.0 IGO; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo/deed.ru>).

Лицензией допускается копирование, распространение и адаптация публикации в некоммерческих целях с указанием библиографической ссылки согласно нижеприведенному образцу. Никакое использование публикации не означает одобрения ВОЗ какой-либо организации, товара или услуги. Использование логотипа ВОЗ не допускается. Распространение адаптированных вариантов публикации допускается на условиях указанной или эквивалентной лицензии Creative Commons. При переводе публикации на другие языки приводятся библиографическая ссылка согласно нижеприведенному образцу и следующая оговорка: «Настоящий перевод не был выполнен Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ). ВОЗ не несет ответственности за содержание или точность перевода. Аутентичным подлинным текстом является оригинальное издание на английском языке».

Урегулирование споров, связанных с условиями лицензии, производится в соответствии с согласительным регламентом Всемирной организации интеллектуальной собственности (<http://www.wipo.int/amc/en/mediation/rules/>).

Образец библиографической ссылки: Лабораторное руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека, шестое издание [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition]. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2023 г. Лицензия: [CC BY-NC-SA 3.0 IGO](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo/).

Данные каталогизации перед публикацией (CIP). Данные CIP доступны по ссылке <http://apps.who.int/iris>.

Приобретение, авторские права и лицензирование. По вопросам приобретения публикаций ВОЗ см. <https://www.who.int/publications/book-orders>. По вопросам оформления заявок на коммерческое использование и направления запросов, касающихся права пользования и лицензирования, см. <https://www.who.int/ru/copyright>.

Материалы третьих сторон. Пользователь, желающий использовать в своих целях содержащиеся в настоящей публикации материалы, принадлежащие третьим сторонам, например таблицы, рисунки или изображения, должен установить, требуется ли для этого разрешение обладателя авторского права, и при необходимости получить такое разрешение. Ответственность за нарушение прав на содержащиеся в публикации материалы третьих сторон несет пользователь.

Оговорки общего характера. Используемые в настоящей публикации обозначения и приводимые в ней материалы не означают выражения мнения ВОЗ относительно правового статуса любой страны, территории, города или района или их органов власти или относительно делимитации границ. Штрихпунктирные линии на картах обозначают приблизительные границы, которые могут быть не полностью согласованы.

Упоминания определенных компаний или продукции определенных производителей не означают, что они одобрены или рекомендованы ВОЗ в отличие от других аналогичных компаний или продукции, не названных в тексте. Названия патентованных изделий, исключая ошибки и пропуски в тексте, выделяются начальными прописными буквами.

ВОЗ приняты все разумные меры для проверки точности информации, содержащейся в настоящей публикации. Однако данные материалы публикуются без каких-либо прямых или косвенных гарантий. Ответственность за интерпретацию и использование материалов несет пользователь. ВОЗ не несет никакой ответственности за ущерб, связанный с использованием материалов.

Перевод на русский язык выполнен Elena Zatsepina. Терминология может не соответствовать другим публикациям ВОЗ. В случае любого несоответствия между английской и русской версией, оригинальная версия на английском языке должна приниматься в качестве обязательной и подлинной.

Содержание

От имени Всемирной организации здравоохранения	vii
Выражение признательности	viii
Акронимы и аббревиатуры, используемые в этом руководстве	xii
Глава 1. Введение	1
1.1 Сфера охвата руководства.....	1
1.2 Введение.....	1
1.3 Шестое издание	3
1.4 Методология подготовки шестого издания «Лабораторного руководства ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека»	5
Глава 2. Базовое исследование	11
2.1 Введение.....	11
2.2 План базового исследования эякулята с указанием сроков.....	14
2.3 Процедуры, предшествующие исследованию	16
2.4 Процедуры исследования и последующие процедуры	18
2.5 Дополнительная информация и комментарии	72
Глава 3. Расширенное исследование	93
3.1 Индексы множественных дефектов сперматозоидов	94
3.2 Фрагментация ДНК сперматозоидов.....	97
3.3 Генетические и геномные исследования.....	118
3.4 Исследования, связанные с иммунологией и иммунологическими методами	121
3.5 Оценка интерлейкинов – маркера воспаления мужских половых путей.....	131
3.6 Оценка незрелых половых клеток в эякуляте	133
3.7 Исследования для обнаружения сперматозоидов, покрытых антителами	134
3.8 Биохимические анализы функции добавочных половых желез	141
3.9 Оценка последовательности эякуляции.....	153
Глава 4. Углубленные исследования	157
4.1 Исследования оксидативного стресса сперматозоидов и активных форм кислорода	158
4.2 Оценка акросомной реакции	162
4.3 Оценка хроматина сперматозоидов.....	168
4.4 Трансмембранный поток и перенос ионов в сперматозоидах	173
4.5 Компьютерный анализ эякулята (CASA).....	175
4.6 Новые технологии	180

Глава 5. Методы подготовки сперматозоидов	183
5.1 Введение.....	183
5.2 Общие принципы	185
5.3 Простое отмывание	186
5.4 Прямое всплытие	187
5.5 Прерывистые градиенты плотности	188
5.6 Сортировка клеток с магнитной активацией (MACS).....	189
5.7 Подготовка образцов ВИЧ-инфицированного эякулята	190
5.8 Подготовка сперматозоидов из ткани яичка и придатка яичка	191
5.9 Подготовка образцов при ретроградной эякуляции.....	192
5.10 Подготовка образцов, полученных в результате ассистированной эякуляции.....	193
Глава 6. Криоконсервация сперматозоидов.....	195
6.1 Введение.....	195
6.2 Причины криоконсервации сперматозоидов	196
6.3 Оценка риска криоконсервации и хранения эякулята человека	199
6.4 Протоколы криоконсервации эякулята.....	202
6.5 Витрификация	208
Глава 7. Обеспечение качества и контроль качества	211
7.1 Контроль качества в андрологической лаборатории.....	212
7.2 Характер ошибок при исследовании эякулята	215
7.3 Программа по ОК	218
7.4 Карты КК для числовых значений	222
7.5 Карты КК для процентных соотношений.....	226
7.6 Оценка X_{bar} - и S-карт	226
7.7 Статистические процедуры для анализа и отчетности по изменчивости результатов, полученных разными лаборантами.....	229
7.8 Внешний контроль качества и процедуры обеспечения качества.....	235
7.9 Частота и приоритетность процедур контроля качества.....	237
7.10 Обучение.....	238
Глава 8. Приложения.....	245
8.1 Интерпретация результатов исследования эякулята.....	245
8.2 Оборудование и безопасность.....	249
8.3 Микроскопия для базового исследования эякулята	257
8.4 Исходные растворы и среды.....	263
8.5 Образец формы для записи результатов исследования эякулята.....	270
8.6 Материал для КК	272
8.7 Национальные программы внешнего контроля качества исследований эякулята	285
Глава 9. Справочная литература.....	287

Перечень таблиц

Таблица 2.1 Достаточные объемы эякулята – конечные объемы разведенных суспензий сперматозоидов для соответствующей обработки	23
Таблица 2.2 Приемлемые различия (на основе 95%-ного доверительного интервала) между двумя процентными значениями для конкретного среднего значения, определенного на основе двойного подсчета 200 сперматозоидов (всего 400 подсчитанных сперматозоидов).....	30
Таблица 2.3 Сравнение различий между результатами подсчета и связь со степенью неопределенности результата	39
Таблица 2.4 Расчеты концентрации сперматозоидов на основе их подсчета.....	41
Таблица 2.5 Этапы фиксации и окрашивания по Папаниколау.....	55
Таблица 2.6 Морфологическая классификация сперматозоидов	59
Таблица 2.7 Мазок 1 с окрашиванием по Папаниколау	64
Таблица 2.8 Мазок 2 с окрашиванием по Папаниколау.....	66
Таблица 2.9 Мазок 3 с окрашиванием по Папаниколау	68
Таблица 2.10 Мазок 4 с окрашиванием по Папаниколау	69
Таблица 2.11 Мазок 5 с окрашиванием по Папаниколау	69
Таблица 2.12 Вероятность наличия необнаруженных сперматозоидов при исследовании влажных препаратов.....	74
Таблица 2.13 Вероятность наличия необнаруженных сперматозоидов после центрифугирования	75
Таблица 2.14 Мазок с окрашиванием по Шорру.....	83
Таблица 2.15 Мазок с окрашиванием DiffQuik	86
Таблица 2.16 Округленные ошибки выборки (в %) и границы 95%-ного доверительного интервала в соответствии с общим числом подсчитанных сперматозоидов.....	87
Таблица 3.1 Расчет индексов множественных дефектов сперматозоидов	95
Таблица 3.2 Индексы дефектов сперматозоидов для мужчин в фертильных и бесплодных парах	96
Таблица 3.3 Базальные уровни дисомии хромосом сперматозоидов у здоровых фертильных мужчин	121
Таблица 3.4 Объем эякулята, необходимый для проведения иммуногранулотеста	138
Таблица 3.5 Рекомендуемые стандартные растворы для оценки концентрации цинка.....	143
Таблица 3.6 Рекомендуемые стандартные растворы для оценки концентрации фруктозы.....	147
Таблица 3.7 Рекомендуемые стандартные растворы для оценки уровней активности α -гликозидазы.....	151
Таблица 7.1 Терминология обеспечения качества и контроля качества	213
Таблица 7.2 Расчеты значений для $X_{\text{бар}}$ -карты	223
Таблица 7.3 Факторы, необходимые для расчета предупредительных границ и пределов для вмешательства для $X_{\text{бар}}$ -карты.....	224
Таблица 7.4 Расчет предупредительных границ и пределов для вмешательства для S-карты	225
Таблица 7.5 Основные правила контроля для карт КК.....	227
Таблица 7.6 Концентрация сперматозоидов ($\times 10^6$ /мл) в пяти образцах для КК, оцененная тремя сотрудниками	232
Таблица 7.7 Отличия значений образцов от среднего значения, рассчитанные путем вычитания среднего значения из значений, полученных для каждого образца эякулята	232
Таблица 7.8 Среднее значение, СО и среднее значение/стандартная ошибка этих различий, рассчитанные для каждого сотрудника (n = число образцов).....	232
Таблица 7.9 Пошаговая инструкция по расчету меры отклонения	233
Таблица 7.10 F-тест двустороннего анализа ANOVA для лаборантов и образцов для КК.....	233
Таблица 7.11 Основные особенности процедур ВКК	234
Таблица 7.12 Временной график КК.....	237
Таблица 7.13 Обзор методов КК.....	238
Таблица 7.14 Источники отклонений (ошибок) при оценке концентрации сперматозоидов.....	240
Таблица 7.15 Источники отклонений (ошибок) при морфологической оценке сперматозоидов	242
Таблица 7.16 Источники отклонений (ошибок) при оценке подвижности сперматозоидов.....	243
Таблица 7.17 Источники отклонений (ошибок) при оценке жизнеспособности сперматозоидов	244
Таблица 8.1 Определение референтной группы в документе Кэмпбелла и др. (5)	246
Таблица 8.2 Происхождение данных для распределения результатов (5)	247
Таблица 8.3 Распределение результатов исследования эякулята мужчин, у партнерш которых в результате незащищенных половых актов, практиковавшихся в течение года, произошло естественное зачатие. Из документа Кэмпбелла и др. (5); пятый перцентиль указан с изменчивостью (95%-ный доверительный интервал)	247
Таблица 8.4 Образец формы для записи результатов исследования эякулята	271

Перечень рисунков

Рис. 2.1 Неспецифическая агрегация сперматозоидов в эякуляте	25
Рис. 2.2 Схематическое изображение разных степеней агглютинации сперматозоидов	26
Рис. 2.3 Вспомогательные инструменты для оценки подвижности сперматозоидов.....	30
Рис. 2.4 Мазок, окрашенный эозин-нигрозином, под световым микроскопом.....	32
Рис. 2.5 Гемоцитометр с улучшенной сеткой Нейбауэра.....	35
Рис. 2.6 Какие сперматозоиды следует подсчитывать в клетках сетки?	36
Рис. 2.7 Исследование всего покровного стекла на предмет наличия подвижных сперматозоидов.....	43
Рис. 2.8 Морфология «идеальных» сперматозоидов.....	50
Рис. 2.9 Приготовление обычного мазка эякулята	52
Рис. 2.10 Схематическое изображение некоторых аномальных форм сперматозоидов человека.....	58
Рис. 2.11 Структурированный порядок морфологической оценки сперматозоидов человека.....	61
Рис. 2.12. Мазок 1 с окрашиванием по Папаниколау	63
Рис. 2.13 Мазок 2 с окрашиванием по Папаниколау	65
Рис. 2.14 Мазок 3 с окрашиванием по Папаниколау	67
Рис. 2.15 Мазок 4 с окрашиванием по Папаниколау	70
Рис. 2.16 Мазок 5 с окрашиванием по Папаниколау	71
Рис. 2.17 Схематическое изображение типичных морфологических изменений сперматозоидов человека, подвергнутых гипоосмотическому стрессу.....	80
Рис. 2.18 Фотографии сперматозоидов, подвергнутых гипоосмотическому стрессу, сделанные под фазово-контрастным микроскопом	80
Рис. 2.19 Мазок с окрашиванием по Шорру	82
Рис. 2.20 Мазок с окрашиванием DiffQuik	85
Рис. 3.1 Предметные стекла TUNEL-теста для обнаружения фрагментации ДНК с использованием флуоресценции	98
Рис. 3.2 Проточная цитометрия для исследования сперматозоидов с использованием пропидия иодида и зеленой флуоресценции	101
Рис. 3.3 Сперматозоиды с ореолом (неповрежденная ДНК, стрелки) и без ореола (фрагментированная ДНК, наконечники стрелок)	110
Рис. 3.4 Comet-тест сперматозоидов с аномальной обширной фрагментацией ДНК и нормальных сперматозоидов без видимых повреждений ДНК при окрашивании бромистым этидием	114
Рис. 3.5 Комета, видимая под микроскопом, и последующая оценка с помощью программного обеспечения CASP (хвост кометы содержит 88% ДНК)	115
Рис. 3.6 Peroxidase-положительные клетки в эякуляте человека	124
Рис. 3.7 Лейкоциты в эякуляте	130
Рис. 3.8 Два примера устройств для сбора разделенного эякулята	154
Рис. 3.9 Пример графического представления результатов исследования нормального четырёхфракционного разделенного эякулята, демонстрирующий распределение таких показателей, как объем, число сперматозоидов, прогрессивная подвижность и уровни цинка и фруктозы	155
Рис. 4.1 Примеры окрашенных FITC-PNA сперматозоидов с целой акросомой и прореагировавшей акросомой, жизнеспособных и нежизнеспособных сперматозоидов	166
Рис. 4.2 Пример AC-положительных (а) и AC-отрицательных (b) сперматозоидов под оптическим микроскопом (×1000, масляная иммерсия)	170
Рис. 4.3 Примеры SMA3-положительных (а) и SMA3-отрицательных (b) сперматозоидов (левая панель).....	172
Рис. 4.4 Стандартная терминология для переменных, измеряемых системами CASA	178
Рис. 4.5 Примеры графического выражения различных приложений CASA	182
Рис. 7.1 X_{bar} -карта на основе данных из таблицы 7.1	224
Рис. 7.2 S-карта концентрации сперматозоидов	226
Рис. 7.3 График Блэнда-Альтмана для оценок процентной доли прогрессивно подвижных сперматозоидов, выполненных ручным методом и методом CASA	230
Рис. 7.4 График Юдена для оценок концентрации сперматозоидов	231
Рис. 8.1 Номограмма для определения центробежной силы по радиусу ротора и скорости вращения	253
Рис. 8.2 Устройство микроскопа.....	258
Рис. 8.3 Схема проведения оценки подвижности сперматозоидов	276
Рис. 8.4 Вид через окуляр с сеткой (красный квадрат).....	277
Рис. 8.5 Вид видеозаписи изображения объект-микрометра на мониторе и расчерченной накладке	277

От имени Всемирной организации здравоохранения

Ключевым условием достижения всеобщего охвата услугами здравоохранения (ВОУЗ), в том числе в области охраны сексуального и репродуктивного здоровья, является обеспечение доступа к высококачественным, научно обоснованным и доступным по стоимости медико-санитарным услугам. Для того, чтобы соответствующие группы населения могли избежать неблагоприятных медицинских и социально-экономических последствий расстройств сексуального и репродуктивного здоровья, необходимо обеспечить всеобщий доступ к лабораторным услугам.

«Лабораторное руководство ВОЗ по исследованию эякулята человека и взаимодействию спермы и цервикальной слизи» было впервые опубликовано в 1980 г. в связи с растущей потребностью в стандартизации процедур исследования эякулята человека. Впоследствии руководство пересматривалось четыре раза (в 1987, 1992, 1999 и 2010 гг.) и было переведено на целый ряд языков.

Руководство является справочным документом по процедурам и методам лабораторного исследования и обработки эякулята человека, которые предназначены для обеспечения и поддержания качества исследований и сопоставимости результатов, полученных в разных лабораториях. Следует отметить, что за последние 40 лет руководство стало признанным стандартом, широко используемым клиническими и исследовательскими лабораториями во всем мире.

Это стандартное руководство предназначается не только для лиц, начинающих заниматься исследованиями эякулята, но и для всех тех, кто обрабатывает и исследует эякулят для определения его параметров в клинических или научных целях. Руководство содержит важную информацию об исследованиях эякулята и его подготовке для клинической оценки, специализированных исследованиях, криоконсервации, контроле качества в лабораториях, проводящих исследования эякулята, и лабораторных исследованиях в рамках обследования мужского бесплодия. Все это имеет решающее значение для мониторинга ответа на терапию и другие меры вмешательства, направленные на улучшение сексуального и репродуктивного здоровья мужчин.

Настоящее шестое издание руководства станет важнейшим источником новейшей научно обоснованной информации о лабораторных процедурах, необходимых для лечения бесплодия. Это издание содержит новые и расширенные разделы о приготовлении образцов эякулята, определении маркеров инфекций, компьютерном анализе сперматозоидов, а также базовых, расширенных и углубленных категориях.

Шестое издание «Лабораторного руководства ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека» будет полезным для программ, направленных на улучшение сексуального и репродуктивного здоровья, включая лечение бесплодия и доступ к нему, в частности среди мужчин, и тем самым поддержит усилия стран по достижению ЦУР 3.7 (обеспечение всеобщего доступа к услугам по охране сексуального и репродуктивного здоровья, включая услуги по планированию семьи). Руководство будет также способствовать достижению ЦУР 3.8 (обеспечение всеобщего охвата услугами здравоохранения, в том числе защиты от финансовых рисков, и доступа к качественным основным медико-санитарным услугам).

ВОЗ и HRP выражают благодарность многочисленным техническим экспертам из разных стран мира, внесшим вклад в обзор и пересмотр данного руководства.

**Иэн Аскью, доктор медицинских наук,
директор Департамента по вопросам охраны сексуального и репродуктивного здоровья и
научным исследованиям, включая Специальную программу ПРООН/ЮНФПА/ЮНИСЕФ/ВОЗ/
Всемирного банка в области воспроизводства населения,
Всемирная организация здравоохранения**

Выражение признательности

Данная публикация подготовлена Департаментом по вопросам охраны сексуального и репродуктивного здоровья и научным исследованиям Всемирной организации здравоохранения (в состав которого входит Специальная программа ПРООН/ЮНФПА/ЮНИСЕФ/ВОЗ/Всемирного банка по научным исследованиям, разработкам и подготовке научных кадров в области воспроизводства населения (HRP)). Выражаем глубокую признательность за участие в подготовке, редактировании и пересмотре данного руководства следующим лицам:

Главный редактор:

д-р Ларс Бьёрндал, доктор медицинских наук

лабораторная медицина,
директор лаборатории андрологии,
ANOVA, клиника эндокринологии,
больница и медицинский факультет Каролинского университета, Худдинге,
Каролинский институт,
Стокгольм, Швеция

Редакционная коллегия:

профессор Олег Аполихин, доктор медицинских наук

андрология,
директор Научно-исследовательского института урологии и интервенционной радиологии им. Н. А. Лопаткина – филиала Национального медицинского исследовательского центра радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Москва, Российская Федерация

профессор Элизабетта Балди, доктор биологических наук

лабораторная медицина,
доцент кафедры клинической патологии, факультет экспериментальной и клинической медицины, Университет Флоренции;
ответственное лицо Центра криоконсервации эякулята,
Университетская больница Кареджи (AOUC),
Флоренция, Италия

профессор Кристофер Л.Р. Баррат, доктор медицинских наук

член Эдинбургского королевского общества
руководитель отделения системной медицины, профессор репродуктивной медицины, медицинский факультет Университета Данди,
Данди, Соединенное Королевство

профессор Марио Филипп Р. Фестин, доктор медицинских наук

магистр образования в области здравоохранения
акушерство и гинекология, клиническая эпидемиология, образование в области здравоохранения, планирование семьи, профессор, кафедра акушерства и гинекологии и кафедра клинической эпидемиологии, Медицинский колледж, Филиппинский университет, Манила; руководитель

Филиппинской исследовательской группы в области репродуктивного здоровья, Национальные институты здоровья, Филиппинский университет, Манила, Филиппины;
консультант Секретариата ВОЗ

д-р Джексон К. Киркман-Браун, кавалер Ордена Британской империи, доктор наук

репродуктология, андрология, здравоохранение, фертильность, лектор и директор Научного центра репродукции человека (НЦРЧ), Колледж медицинских и стоматологических наук, Бирмингемский университет; ответственное лицо HFEA и научный руководитель Бирмингемского центра женской фертильности, Бирмингемский фонд для женщин и детей, Национальная служба здравоохранения, Бирмингем, Соединенное Королевство

профессор Долорес Дж. Лэмб, магистр наук, доктор наук, РЛВС (АСБ)

андрология/урология, клиническая химия (Национальный реестр клинической химии), руководитель лаборатории высокой сложности (РЛВС, Американский совет биоаналитиков), профессор урологии, заместитель председателя по исследованиям (урология), отделение урологии Фонда Джеймса Бьюкенена Брэди; директор Центра репродуктивной геномики, Институт точной медицины им. Энглендера, Медицинский колледж Вайля Корнелла, Нью-Йорк, Соединенные Штаты Америки;
Американское общество репродуктивной медицины

д-р Майкл Мбизво, доктор наук

андрология и репродуктивная эпидемиология, профессор репродуктологии, Университет Зимбабве; директор/старший научный сотрудник, Совет по народонаселению, Лусака, Замбия

профессор Стефан Шлатт, доктор наук

репродуктивная биология, андрология, профессор университета и директор Центра репродуктивной медицины и андрологии, Университет Мюнстера, Германия, Сотрудничающий центр ВОЗ по исследованиям в области мужской репродукции

д-р Игорь Тоскин, доктор медицинских наук

общественное здравоохранение, ИППП, ВИЧ/СПИД, урология, дерматология, эпидемиология, сексуальное и репродуктивное здоровье, научный сотрудник, Департамент по вопросам охраны сексуального и репродуктивного здоровья и научным исследованиям, Всемирная организация здравоохранения, Женева, Швейцария;
Секретариат ВОЗ

д-р Кристина Ван, доктор медицины

эндокринология, андрология (мужская репродукция и контрацепция), профессор медицины, Медицинская школа Дэвида Геффена, Калифорнийский университет в Лос-Анджелесе; отделение эндокринологии, медицинский факультет, Медицинский центр Harbor-UCLA и Институт Лундквиста, Торранс, Калифорния, Соединенные Штаты Америки

Соавторы:

Карел Блондил, магистр наук, врач-ассистент

профилактика ВИЧ/ИППП и сексуальное здоровье, аспирант, факультет медицины и здравоохранения, Гентский университет, Гент, Бельгия;
консультант Секретариата ВОЗ

Петр Хуска, доктор медицины

лабораторная медицина, аспирант, ANOVA, клиника эндокринологии, больница и медицинский факультет Каролинского университета, Худдинге, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

д-р Степан Красняк, доктор медицины

андрология, урология, младший научный сотрудник, отдел андрологии и репродукции человека, Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н. А. Лопаткина – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

Выражаем благодарность Иэну Аскью, Джеймсу Киари и Табо Матсасенгу за их поддержку, оказанную во время проведения совещаний и обсуждений в департаменте.

Выражаем особую благодарность г-же Натали Нарки Маурер, помощнику и секретарю Департамента по вопросам охраны сексуального и репродуктивного здоровья и научным исследованиям Всемирной организации здравоохранения, Женева, Швейцария.

Высоко ценим поддержку, советы и содействие сотрудников ВОЗ Сьюзен Норрис, Ребекки Томас и Иэна Дэвида Колтарта.

Выражаем особую благодарность бывшему сотруднику ВОЗ д-ру Кирстен Фогельсонг за отличное ведение документации, касающейся предыдущих изданий руководства, что облегчило пересмотр последнего издания, а также редактору пятого издания руководства д-ру Тревору Куперу за помощь в работе с данными и другими материалами, имеющими важное значение для обеспечения последовательности и согласованности этого нового издания.

Департамент по вопросам охраны сексуального и репродуктивного здоровья и научным исследованиям Всемирной организации здравоохранения (в состав которого входит Специальная программа ПРООН/ЮНФПА/ЮНИСЕФ/ВОЗ/Всемирного банка по научным исследованиям, разработкам и подготовке научных кадров в области воспроизводства населения (HRP)) выражает благодарность всем участникам открытых обсуждений за внесенный ими вклад.

Выражаем также благодарность:

- д-ру Кристофу Бренкеру, докторанту Центра репродуктивной медицины и андрологии, Университет Мюнстера (за помощь в работе с протоколами окрашивания и микрофотографиями для документирования аномалий сперматозоидов);

- д-ру Меуригу Галлахеру, научному сотруднику Центра системного моделирования и количественной биомедицины, Бирмингемский университет (за содействие в написании разделов о подвижности сперматозоидов и CASA);
- д-ру Монике Муратори, младшему научному сотруднику кафедры экспериментальной и клинической медицины, Университет Флоренции (за содействие в составлении протокола Tunnel-теста для выявления фрагментации ДНК сперматозоидов);
- д-ру Саре Марчиани, младшему научному сотруднику кафедры экспериментальной и клинической медицины, Университет Флоренции (за содействие в составлении протокола оценки статуса хроматина сперматозоидов);
- г-же Елене Александровне Зацепиной, руководителю русской секции переводов ВОЗ, 2015 – 2018 (за перевод данного пособия на русский язык);
- д-ру Степану Сергеевичу Красняку, к.м.н., ведущему научному сотруднику отдела андрологии и репродукции человека НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина, филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (за помощь в техническом редактировании данного пособия на русском языке).



**Д-р Кристина Ван,
доктор медицины**

Это шестое издание «Руководства ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека», которое в последние годы стало одним из наиболее часто скачиваемых документов на веб-сайте ВОЗ.

Д-р Кристина Ван работала над руководством с момента его первого издания в 1980 г. (на тот момент это было «Лабораторное руководство ВОЗ по исследованию эякулята человека и взаимодействия спермы и цервикальной слизи») и продолжала участвовать в работе над нынешним шестым изданием, являясь активным членом редакционной коллегии.

Д-р Ван – профессор медицины в Медицинской школе Дэвида Геффена при Калифорнийском университете в Лос-Анджелесе. Она работает в отделении эндокринологии медицинского факультета и является директором Института клинических и трансляционных исследований при Институте Лундквиста и Медицинском центре Harbor-UCLA.

Д-р Ван является признанным во всем мире исследователем в области мужской репродуктивной медицины и биологии. В течение многих лет она продолжает возглавлять усилия по разработке безопасных и эффективных средств обратимой гормональной контрацепции для мужчин, оптимальных методов заместительной гормональной терапии для мужчин и новой андроген-заместительной терапии для мужчин с гипогонадизмом. Помимо вышеперечисленного д-р Ван возглавляет ряд других значимых исследовательских проектов и инициатив – от фундаментальных исследований до клинических испытаний, – направленных на улучшение репродуктивного здоровья.

Всемирная организация здравоохранения хотела бы отметить выдающийся вклад д-ра Ван в разработку всех шести изданий «Руководства ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека». Ее участие позволило обеспечить как высокий уровень технических знаний, положенных в основу руководства, так и институциональную преемственность всех изданий этого важного документа.

Акронимы и аббревиатуры, используемые в этом руководстве

BPT	вспомогательные репродуктивные технологии
BSA	альбумин бычьей сыворотки
BWW	среда Biggers, Whitten and Whittingham
CASA	компьютерный анализ эякулята
CASMA	компьютерная морфометрическая оценка сперматозоидов
CD45	кластер определения 45 (панлейкоцитарный маркер)
CD46	кластер определения 46 (акрысомальный антиген)
CMA3	хромомицин А3
ЦГП	центрифугирование в градиенте плотности
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
DNase	дезоксирибонуклеаза
DPBS	фосфатно-солевой буферный раствор Дюльбекко
DTT	дитиотрейтол
EBSS	сбалансированный солевой раствор Эрла
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ВнОК	внешняя оценка качества
ВнКК	внешний контроль качества
FITC	флуоресцинизотиоцианат
GEYC	глицерин-цитрат яичного желтка
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
MVP	микроскопия высокого разрешения
HSA	сывороточный альбумин человека
HTF	human tubal fluid (жидкость маточной трубы человека)
ИКСИ	интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида
Ig	иммуноглобулин
ВКК	внутренний контроль качества
МЕ	международная единица
ВМИ	внутриматочная инсеминация
ЭКО	экстракорпоральное оплодотворение
NA	числовая апертура
КК	контроль качества
sEBSS	дополненный сбалансированный солевой раствор Эрла
CO	стандартное отклонение
ФДС	фрагментация ДНК сперматозоида
СОП	стандартная операционная процедура
ИТЗ	индекс тератозооспермии
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения



Глава 1. Введение

1.1 Сфера охвата руководства.....	1
1.2 Введение	1
1.3 Шестое издание.....	3
1.4 Методология подготовки шестого издания «Лабораторного руководства ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека»	5

1.1 Сфера охвата руководства

Общей целью руководства является описание лабораторных методов исследования эякулята для содействия улучшению оценки мужской репродуктивной функции и лечения субфертильности, обусловленной мужским фактором, в глобальных масштабах.

Приведенные здесь методы могут быть использованы в качестве стандартных операционных процедур не только в андрологических лабораториях, но и в любых лабораториях, проводящих исследования эякулята. Принятие и практическое использование в лабораториях основных методов, описанных в главе 2, может способствовать улучшению качества исследований эякулята и сопоставимости результатов, полученных в разных лабораториях. Расширенные методы оценки эякулята и исследования, описанные в последующих главах, включены для технологов, научных сотрудников и клиницистов, которым требуется дополнительная информация о функциональной способности сперматозоидов и мужских репродуктивных органов. Эта информация может быть полезна для исследования субфертильности, обусловленной мужским фактором, а также для мониторинга параметров эякулята при использовании мужских методов контрацепции и проведении эпидемиологических исследований в области мужского репродуктивного здоровья.

1.2 Введение

«Лабораторное руководство ВОЗ по исследованию эякулята человека и взаимодействия спермы и цервикальной слизи» было впервые опубликовано в 1980 г. в связи с растущей потребностью в стандартизации процедур исследования эякулята человека. Руководство пересматривалось четыре раза (1-5), широко читалось и было переведено на целый ряд языков. Следует отметить, что за последние 40 лет руководство стало признанным стандартом, широко используемым клиническими и исследовательскими лабораториями во всем мире. Это не только методическое руководство для лиц, начинающих заниматься исследованиями эякулята, но и справочное пособие для всех тех, кто обрабатывает эякулят и должен анализировать и определять его параметры в целях клинической практики или клинических и эпидемиологических исследований.

Исследования эякулята важны по разным причинам:

- оценка мужской репродуктивной функции и проходимости половых путей для проведения соответствующего лечения мужской субфертильности и мониторинга ответа на терапию;
- оценка потенциала фертильности и выбор подходящего метода лечения для бесплодных пар;
- оценка эффективности мужской контрацепции (например, окклюзия семявыносящего протока и меры вмешательства, включая гормональную мужскую контрацепцию и другие возможные методы).

Клиническая оценка и исследование эякулята мужчины могут помочь врачу определить, как продолжать дальнейшее обследование и ведение субфертильной пары. В предыдущем издании данного руководства были приведены референсные диапазоны для обычно измеряемых параметров эякулята, в основу которых положены данные, характеризующие параметры эякулята мужчин, партнерши которых смогли забеременеть в течение 12 или менее месяцев. Эти распределения значений были определены стандартными методами, используемыми в клинической химии для определения референсных диапазонов, однако при этом важно отметить, что они не могут быть использованы в качестве отличительных границ между фертильными и субфертильными мужчинами (6). Несмотря на то, что географические районы, в которых были установлены параметры эякулята и сперматозоидов, не являются широко представленными, что позволило бы обеспечить репрезентативность мужчин из большинства групп населения, эти распределения значений используются во всем мире. Кроме того, использованию одних лишь параметров исследования эякулята для составления прогноза в отношении спонтанного или искусственного оплодотворения препятствуют многие известные и неизвестные женские факторы. Лучшая прогностическая ценность результатов исследования эякулята может быть обеспечена благодаря использованию сочетания нескольких параметров (7-9). Существующие методы исследования эякулята позволяют получить ответы на многие вопросы, но для ответа на многие другие вопросы требуются другие исследования (10). Для отдельно взятого пациента исследование эякулята никогда не является прогностическим в отношении фертильности, поскольку для определения фертильности или субфертильности необходимо принимать во внимание потенциал фертильности пары.

Несмотря на успешное использование предыдущих изданий руководства, стало очевидно, что пятое издание не обеспечивает оптимальный формат для выполнения лаборантами или научными сотрудниками пошаговой процедуры лабораторного исследования эякулята. Кроме того, за последние 10 лет был утвержден целый ряд новых тестов эякулята в клинических и исследовательских целях, которые должны быть рассмотрены в руководстве. Исходя из этих соображений, ВОЗ сформировала редакционный комитет при поддержке Секретариата ВОЗ для рассмотрения всех методов, описанных в руководстве, с целью их одобрения, изменения или обновления. Если при использовании методов, описанных в руководстве, было получено недостаточно данных или они не были подтверждены более чем в одной лаборатории, редакционный комитет вырабатывал консенсусную позицию после оценки соответствующей литературы. Кроме того, был проведен обновленный обзор распределения значений параметров эякулята и сперматозоидов, полученных у предположительно фертильных мужчин, с целью включения данных, по возможности, из всех групп населения.



Отсутствие четких инструкций в отношении порядка выполнения исследований после доставки образцов эякулята в лаборатории привело к тому, что некоторые лаборатории стали использовать методики, описанные в других ресурсах. Другие лаборатории разработали свои собственные версии этих методик, утверждая при этом, что они проводят исследования эякулята в соответствии с руководством ВОЗ (11). Поэтому для облегчения глобальных сопоставлений в новое издание руководства включены пошаговые процедуры и контрольные перечни, которые делают его удобным для использования лаборантами и научными сотрудниками.

1.3 Шестое издание

Шестое издание состоит из трех частей: исследование эякулята (**главы 2, 3 и 4**), подготовка и криоконсервация эякулята (**главы 5 и 6**) и оценка качества и контроль качества (**глава 7**). Процедуры исследования эякулята описываются в трех главах: базовые исследования, которые представляют собой надежные стандартные процедуры для определения параметров эякулята, которые могут выполнять не только андрологические, но и любые другие лаборатории, проводящие исследования эякулята; расширенные исследования, которые могут проводиться в определенных ситуациях по выбору лаборатории или по специальному запросу врача; и углубленные исследования, которые в настоящее время не считаются стандартными для использования в целях первичной оценки мужской субфертильности. Поскольку посев спермы в андрологических лабораториях не производится, он упоминается только в разделе о стерильном сборе эякулята. Раздел о подготовке эякулята охватывает не только эякулят, но и сперматозоиды, полученные из яичек и придатков яичек. Следует отметить, что исследования цервикальной слизи человека были исключены из нового издания, поскольку они более не используются в клинической практике. Новое издание написано в виде простого и понятного методического руководства для тех, кто проводит исследования эякулята, при этом справочная информация и обоснование исследования приводятся отдельно от описания процедуры.

Ниже перечислены основные особенности настоящего шестого издания.

- Главы, посвященные **исследованию эякулята**, содержат подробное описание пошаговых процедур, расчетов и интерпретаций, с тем чтобы изложение конкретных методик было по существу полным и содержало минимальные перекрестные ссылки на другие части руководства.
- **Базовые исследования**
 - *Оценка числа сперматозоидов:*
 - Разведение эякулята упрощено, но в каждом препарате следует подсчитывать 200 сперматозоидов.
 - Важно, чтобы лаборатории не прекращали оценивать число сперматозоидов при низких концентрациях (2 млн/мл), как предлагалось в предыдущем издании, а регистрировали и более низкие уровни концентрации, принимая во внимание тот факт, что ошибки в подсчете небольшого числа сперматозоидов могут быть весьма значительными. Для повышения точности и достоверности очень низких уровней концентрации сперматозоидов могут потребоваться дополнительные методы, описанные в данной главе.



- Общее число сперматозоидов в эякуляте (выработка сперматозоидов) имеет более важное диагностическое значение, чем концентрация сперматозоидов, но при точно измеренном объеме эякулята.
 - Раздел об *оценке азооспермии* оставлен, и *процедуры центрифугирования и использования красителей для живых сперматозоидов* также включены в качестве методов обнаружения сперматозоидов в нефиксированных образцах для оценки эякулята после вазэктомии или в случаях, когда выработка сперматозоидов значительно подавлена контрацептивами.
- *Оценка подвижности сперматозоидов.* При категоризации сперматозоидов по подвижности снова учитываются быстрые прогрессивно подвижные, медленные прогрессивно подвижные, непрогрессивно подвижные и неподвижные сперматозоиды (категории a, b, c или d), поскольку наличие (или отсутствие) быстрых прогрессивно подвижных сперматозоидов имеет клиническое значение (12).
 - *Морфологическая оценка сперматозоидов.* Описана процедура морфологической оценки сперматозоидов с использованием систематического подхода, которой следует придерживаться. В данное издание включено большее число более качественных микрофотографий сперматозоидов из необработанных образцов эякулята, считающихся нормальными, пограничными или аномальными, которые сопровождаются пояснениями того, почему каждый сперматозоид отнесен к той или иной категории. Это должно помочь в подготовке лаборантов в области последовательного определения тонких особенностей морфологии сперматозоидов.
- **Расширенные исследования.** Эта глава была существенно переработана и теперь содержит описание не только процедур для выявления лейкоцитов, незрелых половых клеток и антиспермальных антител, индексов множественных дефектов сперматозоидов и биохимических исследований функции добавочных половых желез, но и методов для выявления анеуплоидии сперматозоидов и содержащегося в них генетического материала, а также фрагментации ДНК.
 - **Углубленные исследования.** Этот раздел охватывает исследования, основанные на использовании как узкоспециализированных и преимущественно исследовательских методов, так и других новых технологий. Данная глава была существенно переработана. Устаревшие исследования, такие как тест на связывание с ооцитом человека и блестящей оболочкой ооцита человека, а также тест на проникновение в ооцит хомячка, были исключены из руководства. Описания этих тестов можно найти в пятом издании. Исследовательские тесты, описанные в этом издании, включают оценку свободных радикалов и оксидативного стресса, мембранных ионных каналов, акросомной реакции и хроматина сперматозоидов. Раздел о *компьютерном анализе эякулята (CASA)* был пересмотрен для включения описания принципов CASA и его использования в качестве исследовательской технологии. Кроме того, появляющиеся новые методы, направленные на изучение подвижности сперматозоидов и ее изменения под воздействием света, могут стать основой для измерения подвижности сперматозоидов без использования микроскопа.
 - Главы о **подготовке** эякулята и **криоконсервации** сперматозоидов были обновлены.

- **Контроль качества.** Эта глава была пересмотрена, с тем чтобы сделать ее более удобной для лиц, не являющихся статистиками. Для обеспечения надежности аналитических методов необходим строгий контроль качества при исследовании эякулята. Следует применять процедуры как внутреннего, так и внешнего контроля качества. В настоящем издании приводятся рекомендации и предложения в отношении того, как улучшить работу лабораторий в тех случаях, когда результаты контроля качества являются неудовлетворительными.
- **Уровни принятия решений являются более точными, чем референсные диапазоны и референсные пределы.** Распределения результатов исследования эякулята, собранного у предположительно фертильных мужчин, недостаточно для установления клинически полезных уровней принятия решений. Данные, характеризующие параметры эякулята контрольной группы населения (мужчины, партнерши которых смогли забеременеть в течение 12 или менее месяцев), были пересмотрены (**раздел 8.1 на стр. 245**). Были учтены данные, не представленные ранее, и данные, полученные в отношении более разнообразных групп населения, и эти исследования подтвердили распределение результатов, определенное в пятом издании руководства. Распределение этих данных представлено с односторонними интервалами (крайние значения данных контрольной группы населения), хотя эти процентиля не представляют собой четких границ между фертильными и субфертильными мужчинами.

1.4 Методология подготовки шестого издания «Лабораторного руководства ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека»

Марио Филипп Р. Фестин и Игорь Тоскин

«Лабораторное руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека» вышло в шестом издании. Пятое издание стало одной из самых популярных публикаций ВОЗ с момента его выпуска в 2010 г., причем даже в последние годы число скачиваний этого документа неуклонно возрастало (95 975 в 2018 г., 120 803 в 2019 г. и 132 765 в 2020 г.).

Это стандартное руководство используется андрологическими лабораториями, а также другими лабораториями, проводящими исследования эякулята, клиниками и исследовательскими институтами во всем мире. К 2021 г. оно упоминалось более чем в 3000 рецензируемых статей и обзоров. Руководство распространялось на международных конгрессах и научных совещаниях, а также в рамках учебных программ сотрудничающих центров ВОЗ, профессиональных обществ и других научно-образовательных учреждений.

Ниже приводится описание процесса настоящего пересмотра. В рамках Департамента по вопросам охраны сексуального и репродуктивного здоровья и научным исследованиям (RHR) был сформирован секретариат по подготовке руководства на основе списка членов предыдущей редакционной группы и в консультации с сотрудничающими учреждениями департамента. Был разработан план по составлению списка членов предлагаемой редакционной коллегии.



Список возможных авторов следующего издания был составлен на основе изучения выступлений докладчиков на конгрессах андрологов, обзора авторов пятого издания руководства и анализа мировой рецензируемой медицинской литературы по андрологии и исследованиям эякулята. Окончательный отбор был сделан с учетом достижений в области исследований эякулята и связанной с этим практической деятельности, рецензируемых публикаций и признанных на международном уровне экспертных знаний, а также надлежащего соотношения между клинической практикой и лабораторным опытом. Была предпринята попытка обеспечить оптимальную представленность андрологов, лабораторных экспертов, урологов, научных работников, эпидемиологов и других специалистов.

Была сформирована основная редакционная группа из восьми человек, которая при необходимости могла приступить к формированию более многочисленной группы авторов. Основная редакционная группа была отобрана с учетом активного сотрудничества с департаментом в последние годы и предыдущего опыта работы над руководством по исследованию и обработке эякулята. При необходимости основная редакционная группа привлекала к работе остальных членов расширенной группы соавторов. Членам редакционной коллегии и соавторам какие-либо гонорары или вознаграждения не выплачивались.

После того как список основных редакторов был окончательно сформирован, ВОЗ предложила им стать членами редакционной коллегии с определенным кругом полномочий. Представленные ими резюме, индивидуальные соглашения и декларации возможных конфликтов интересов сохранены в архиве. На начальном этапе информационное взаимодействие происходило в основном посредством телеконференций, а позднее стали также проводиться очные совещания в Женеве и других местах.

Предлагаемые задачи основной редакционной группы из восьми человек заключались в следующем:

- по мере необходимости предлагать других членов группы соавторов;
- устанавливать критерии для отбора соавторов;
- определять темы для пересмотра и обновления;
- разработать процесс для определения сферы охвата настоящего издания.

В состав редакционной коллегии шестого издания «Лабораторного руководства ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека» вошли:

- Олег Аполихин – <https://ecuro.ru/en/node/3485>
- Элизабетта Балди – <https://www.unifi.it/p-doc2-0-0-A-3f2a3d2a393028.html>
- Кристофер Баррат – <https://www.dundee.ac.uk/people/christopher-barratt>
- Ларс Бьёрндал – <https://ki.se/en/people/larsbjor>
- Джексон Киркман-Браун – <https://www.birmingham.ac.uk/staff/profiles/metabolism-systems/kirkman-brown-jackson.aspx>

- Долорес Лэмб – <https://urology.weillcornell.org/dolores-lamb>
- Майкл Мбизво – <https://www.popcouncil.org/research/expert/michael-mbizvo>
- Стефан Шлатт – <https://www.medizin.uni-muenster.de/cera/cera-forschung/experimentelle-und-translazionale-forschung-zum-hoden/arbeitsgruppe/univ-prof-dr-rer-nat-stefan-schlatt-1.html>
- Кристина Ван – <https://lundquist.org/christina-chung-lun-wang-md>

В секретариат по подготовке руководства на уровне ВОЗ вошли Игорь Тоскин и Марио Фестин.

Для содействия основным членам редакционной группы в ее состав в качестве соавторов были введены дополнительные члены:

- Петр Хуска
- Степан Красняк
- Карел Блондил.

Круг их полномочий включал:

- пересмотр классификации и изложения процедур для улучшения их понимания техническим персоналом;
- подготовку более четкой презентации иллюстраций и фотографий;
- оптимизацию использования контента, представленного во вставленных в основной текст боксах, путем его включения в основной текст там, где это целесообразно;
- проверку и обновление референсных стандартных значений из предыдущего издания.

Секретариат RHR ВОЗ проконсультировался с Комитетом ВОЗ по обзору руководящих принципов (GRC), который принимает решение в отношении того, должен ли соблюдаться установленный для разработки руководящих принципов процесс документирования, рассмотрения и утверждения. После рассмотрения GRC отметил, что в предыдущих изданиях руководства рассматривались вопросы сбора и подготовки образцов, их исследования и интерпретации результатов, включая референсные значения для числа, морфологии, подвижности и других характеристик. Комитет не вынес рекомендаций в отношении того, когда и как действовать в случае аномальных значений.

В руководстве представлены только стандартизированные процедуры, которым необходимо следовать при проведении лабораторных тестов и исследований; в нем не содержится каких-либо клинических или практических рекомендаций, поскольку это находится за пределами сферы охвата руководства, как отметил GRC. В соответствии с его рекомендациями содержащиеся в руководстве выводы и информация, включая ссылки, если таковые имеются, должны быть по-прежнему основаны на наилучших имеющихся фактических данных. Руководство должно соответствовать стандартам ВОЗ в области

разработки и публикации документов, включая подачу деклараций о конфликтах интересов, управление внешними комитетами, стиль ВОЗ, процесс утверждения и др. В соответствующих случаях оно должно быть связано с действующими руководствами ВОЗ по лечению бесплодия и контрацепции. Цель руководства по-прежнему заключается в описании процедур и способов установления местных стандартов для референсных значений. ВОЗ получила подтверждение от GRC, что для настоящего руководства не требуется его одобрения или утверждения, поскольку в своем нынешнем формате оно не является документом, содержащим руководящие принципы.

Кроме того, на уровне ВОЗ были установлены надлежащие связи с Департаментом лабораторных стандартов для получения рекомендаций по содержанию и процедурам, особенно по установлению стандартов в рамках руководств.

Планирование было утверждено Комитетом по документам Департамента ВОЗ по охране сексуального и репродуктивного здоровья и научным исследованиям, и по завершении работы над документом было получено разрешение на его публикацию. Решения о других публикациях по результатам обзоров и обсуждений в ходе подготовки настоящего руководства будут приниматься и согласовываться редакционной коллегией.

Основная редакционная группа определила возможные темы, касающиеся факторов, оказывающих воздействие на параметры эякулята. В рамках подготовки руководства был проведен обзор литературы по конкретным научно-исследовательским вопросам. Решения по итогам обсуждения конкретных вопросов или тем принимались на основе консенсуса или открытого голосования. Для содействия процессу обмена данными, обзора и обновления была создана электронная платформа. Редакционная группа рассмотрела также и другие темы для включения, изменения или исключения из настоящей версии руководства. Были приняты решения в отношении формата, тем для включения, тем для исключения и сроков. В период с 2017 по 2020 гг. была проведена серия телеконференций, велась индивидуальная и групповая переписка по электронной почте и было организовано два очных совещания.

По некоторым из числа определенных группой тем требовалось провести обзор литературы. Это помогло редакционной коллегии в работе над темами, в отношении которых могла существовать некоторая неопределенность либо в связи с тем, что они касаются новейших технологических разработок, либо из-за отсутствия фактических данных или опыта. Это легло в основу обсуждений, необходимых для принятия некоторых важных решений. Темы, для которых потребовался обзор литературы, включали:

- новейшие процедуры оценки качества эякулята; и
- факторы, оказывающие воздействие на качество эякулята, такие как факторы, связанные с окружающей средой, использованием лекарственных средств, возрастом, здоровьем, и др. (в качестве составной части руководства или как отдельные обзорные документы для публикации).

Для каждой главы и для всего руководства были подготовлены временные графики. Они охватывали:

- краткое содержание глав;



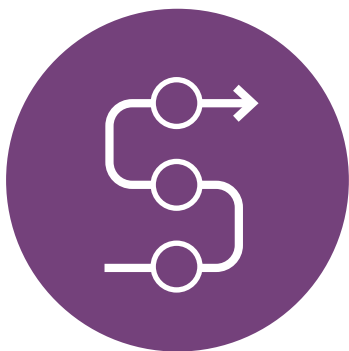
- представление первого проекта;
- обзор основной редакционной группой;
- представление второго проекта;
- обзор основной редакционной группой;
- утверждение главным редактором;
- проверку главным редактором на предмет согласованности всех глав;
- внутренний обзор ВОЗ;
- внешний обзор другими техническими экспертами по андрологии или исследованию эякулята;
- открытое обсуждение (как часть стандартных процедур при подготовке документов ВОЗ); и
- окончательную доработку документа после сопоставления и обобщения всех обзоров и замечаний.

В открытом обсуждении приняли участие эксперты из 43 стран всех 6 регионов ВОЗ.

В приложении к руководству приводится распределение результатов исследования эякулята, собранного у мужчин, партнерши которых забеременели в течение 12 месяцев (**раздел 8.1 на стр. 245**), а с более подробным описанием шагов, предпринимаемых для повторного изучения и обновления распределения референсных значений, можно ознакомиться в отдельном документе, подготовленном группой авторов, в которую вошли некоторые члены редакционной коллегии. Основные выводы этого документа приведены в приложении 8 (см. ссылку ниже). Документы по другим темам, выходящим за пределы сферы охвата руководства, включая ландшафтный анализ новых технологий, будут также опубликованы отдельно.

Ссылка на документ о распределении референсных значений:

Campbell MJ, Lotti F, Baldi E, Schlatt S, Festin MPR, Björndahl L, Toskin I, Barratt CLR. Distribution of semen examination results 2020 - A follow up of data collated for the WHO semen analysis manual 2010. *Andrology*. 2021 May;9(3):817-822. doi: 10.1111/andr.12983. Epub 2021 Mar 17.



Глава 2. Базовое исследование

2.1 Введение	11
2.2 План базового исследования эякулята с указанием сроков.....	14
2.3 Процедуры, предшествующие исследованию	16
2.4 Процедуры исследования и последующие процедуры	18
2.5 Дополнительная информация и комментарии	72

Базовыми исследованиями являются те исследования, которые может проводить любая лаборатория, исследующая эякулят человека. Описанные здесь методы призваны обеспечить наилучшее сочетание высочайшей надежности и самого практичного осуществления. И хотя аналогичные результаты могут быть достигнуты при использовании альтернативных методик, для обеспечения клинической и научной стандартизации крайне важно использовать сопоставимые методы. Такой подход закладывает фундамент для надлежащего развития науки, лежащей в основе охраны мужского репродуктивного здоровья.

“

Для получения достоверной информации необходимо, чтобы все аспекты сбора и исследования эякулята оценивались на основе использования надлежащим образом стандартизированных процедур.

”

2.1 Введение

В отличие от большинства других биологических жидкостей организма человека, исследуемых с целью диагностики или последующего лечения, эякулят представляет собой гетерогенную смесь секретов, которая не существует в организме до семяизвержения. Эякулят образуется из концентрированной суспензии сперматозоидов, хранящейся в придатке яичек, которая смешивается, в основном, с секретом предстательной железы в уретре (и разжижается им), а затем с секретом опорожняемых семенных пузырьков (13). В этой связи состав последовательных фракций эякулята неодинаков. Сравнение объема эякулята до и после вазэктомии показывает, что около 90% его объема составляет секрет добавочных половых желез (14) – в основном предстательной железы и семенных пузырьков и в меньшей степени бульбоуретральных (куперовых) желез и придатка яичка.

Эякулят имеет два основных количественных параметра:

- **Число сперматозоидов** характеризует выработку спермы яичками, проходимость пост-тестикулярной системы протоков, эффективность сокращений гладких мышц придатка яичка и семявыносящих протоков для активного переноса сперматозоидов в уретру, а также эффективность эрекции и эякуляции для выброса эякулята, богатого сперматозоидами. На последние аспекты влияет сексуальное возбуждение (продолжительность и качество), вызываемое нервными сигналами, которые передаются гладкомышечным клеткам (семявыносящих протоков, желез, сфинктера мочевого пузыря), а также гладкомышечным клеткам, контролирующим приток крови в эректильные ткани пениса и отток крови из них, и поперечнополосатым бульбокавернозным и промежностным мышцам.
- **Объем жидкости, вырабатываемой различными добавочными железами,** характеризует секреторную активность желез и последующие сокращения гладкой мускулатуры, способствующие опорожнению каждой железы. Такая активность является ответом на автономную нервную стимуляцию, вызванную сексуальным возбуждением и подготовкой к эякуляции.

Качество сперматозоидов (их жизнеспособность, подвижность и морфология) и состав жидкостей эякулята также важны для функционирования сперматозоидов. Вместе с тем между ситуациями *in vivo* и *in vitro* существуют значительные различия в плане воздействия жидкостей эякулята на сперматозоиды

В результате коитуса первичная, богатая сперматозоидами простатическая фракция эякулята, по всей вероятности, вступает в контакт с цервикальной слизью во влагалище (15) без какого-либо существенного контакта с остальной частью эякулята. В отличие от этого в лабораторных условиях весь эякулят собирается в один контейнер, где сперматозоиды попадают в гель, образуемый белками семенных пузырьков. *In vitro* этот гель впоследствии разжижается под действием протеаз простаты, что приводит к повышению его осмоляльности (13, 16-18).

Существуют некоторые данные о том, что общий объем и содержание сперматозоидов в эякуляте зависят от обстоятельств, при которых он получен. Эякулят, собранный в контейнер посредством мастурбации в комнате рядом с лабораторией, может иметь более низкие показатели, чем эякулят, извлеченный из неспермицидного презерватива, использованного во время коитуса в домашних условиях (19). Это различие может быть обусловлено разными уровнями и продолжительностью сексуального возбуждения, поскольку время, затраченное на получение образца посредством мастурбации, также влияет на объем и содержание эякулята (20).

В конкретных условиях сбора параметры эякулята зависят от факторов, которые обычно не могут быть изменены, таких как выработка сперматозоидов в яичках, секрет добавочных половых желез и недавно перенесенное (особенно лихорадочное) заболевание, а также от других факторов, таких как воздержание от эякуляции, которые следует указывать и учитывать при интерпретации результатов.

Результаты лабораторных измерений параметров эякулята зависят от следующих факторов:

- Обеспечение сбора всего эякулята полностью. Первые фракции, выделяемые во время эякуляции, представляют собой в основном богатую сперматозоидами простатическую жидкость, тогда как в более поздних фракциях преобладает жидкость семенных пузырьков (13). Поэтому потеря первой (богатой сперматозоидами) порции эякулята оказывает большее влияние на результаты исследования, чем потеря последней порции.
- Деятельность добавочных половых желез, жидкость которых разбавляет концентрированные эпидидимальные сперматозоиды при эякуляции (21). Концентрация сперматозоидов не является прямым показателем выработки спермы яичками, поскольку на нее влияет секреция других органов. Поэтому лучшим показателем способности выработки сперматозоидов является общее число эякулированных сперматозоидов (концентрация сперматозоидов, умноженная на объем эякулята). Так, например, концентрация сперматозоидов в эякуляте молодых и пожилых мужчин может быть одинаковой, но общее число сперматозоидов может отличаться, поскольку и объем семенной жидкости, и общая выработка сперматозоидов с возрастом уменьшаются, по меньшей мере в некоторых группах населения (23).
- Время между сбором исследуемого эякулята и предыдущей эякуляцией (период эякуляторного воздержания – «время воздержания», называемое иногда менее конкретно сексуальным воздержанием). Сперматозоиды накапливаются в придатке яичка до полного заполнения, затем перетекают в уретру и выводятся с мочой (24, 25). Поскольку при одной эякуляции придаток яичка никогда не опорожняется полностью (24), некоторые сперматозоиды остаются в нем со времени предыдущей эякуляции. Это влияет на диапазон возраста и качества сперматозоидов в эякуляте (26). В случае если функция придатка яичка не нарушена (29), увеличение продолжительности воздержания не оказывает воздействия на жизнеспособность и хроматин сперматозоидов (27, 28). Более того, многочисленные исследования по определению суточной выработки сперматозоидов показали, что для истощения хранилища сперматозоидов в придатке яичка необходимы ежедневные эякуляции на протяжении 2–3 дней (30, 31). Таким образом, основанная на клиническом опыте рекомендация в отношении сбора эякулята для исследования после воздержания в течение 2–7 дней может приводить к варьируемым результатам и нечеткому разграничению между нормальными и субфертильными результатами. Степень такого влияния трудно установить, и оно редко учитывается.

Основные факторы, связанные с пациентом, которые оказывают воздействие на эякулят, включают следующие:

- Размер яичек, который оказывает воздействие на общее число вырабатываемых в день сперматозоидов и, таким образом, косвенно на количество эякулята (2, 32–34). Размер яичек характеризует уровень потенциала сперматогенеза, который также связан с морфологией сперматозоидов (35).
- Эндокринный статус (36).
- Лекарственные препараты, которые принимает мужчина. Например, перенос сперматозоидов из придатка яичка в уретру зависит от активации



альфа-1-рецепторов в гладкомышечных клетках семявыносящих протоков. Прием альфа-блокаторов (при лечении гипертензии и симптоматическом лечении гипертрофии простаты) или селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС) для лечения депрессии (таких как сертралин, флуоксетин, амитриптилин) может подавлять подвижность семявыносящих протоков (37), а также опорожнение добавочных половых желез.

- Добавки или непрописанные лекарства, такие как анаболические стероиды.

Эти изменчивые и в значительной степени неконтролируемые факторы способствуют хорошо известной вариабельности состава эякулята у разных людей (38, 39).

Есть данные, что результатов исследования одного единственного эякулята достаточно для принятия решения о последующих этапах обследования мужчины на предмет бесплодия (9). С другой стороны, для определения точных базовых данных для конкретного мужчины может потребоваться исследование двух или трех эякулятов (40-44).

Хотя измерения, проведенные в отношении всей популяции сперматозоидов в эякуляте, не могут определить оплодотворяющую способность тех немногих сперматозоидов, которые достигают места оплодотворения, исследование эякулята, тем не менее, позволяет получить важную информацию о функциональном состоянии репродуктивных органов мужчины. Для получения достоверной – то есть значимой и полезной – информации все аспекты сбора и исследования эякулята должны быть оценены на основе использования надлежащим образом стандартизированных процедур. Методы, описанные в этой главе, являются общепринятыми процедурами, которые представляют собой основные этапы оценки эякулята.

2.2 План базового исследования эякулята с указанием сроков

Базовое исследование эякулята включает следующие этапы (которые подробно описаны в последующих разделах) (45, 46).

2.2.1 Подготовка – процедуры, предшествующие исследованию

Процедуры, предшествующие исследованию, включают:

- информирование пациента;
- сбор образца;
- получение образца;
- первичную обработку образца.

2.2.1.1 В течение первых 5 минут – первичная обработка образца

По практическим соображениям объем образца удобно определять путем взвешивания на этапе, предшествующем исследованию.

- Измерение объема эякулята по весу предпочтительно проводить в момент получения образца и до его разжижения.
- Предоставьте время для разжижения (обычно не более 30 минут).

2.2.2 Процедуры исследования

Процедуры исследования эякулята делятся на оценку, которую нельзя откладывать без риска возникновения лабораторно индуцированных патологических изменений, и процедуры, которые могут быть выполнены позднее без такого риска. Это позволяет лаборатории организовать эффективный рабочий процесс без ущерба для качества исследования.

2.2.2.1 От 30 до 60 минут после сбора эякулята

- Оцените разжижение и макроскопический вид эякулята.
- Приготовьте влажный препарат для оценки микроскопического вида, подвижности сперматозоидов и разжижения, необходимого для оценки концентрации сперматозоидов.
- Измерьте pH эякулята (при наличии показаний).
- Оцените жизнеспособность сперматозоидов (при низкой процентной доле подвижных клеток).
- Приготовьте разведенный эякулят для оценки концентрации сперматозоидов.
- Приготовьте мазки для морфологической оценки сперматозоидов и фиксации мазков.
- Выполните тест смешанной антиглобулиновой реакции (MAR-тест) на наличие антиспермальных антител (при необходимости).
- Оцените наличие лейкоцитов (при необходимости).
- Центрифугируйте аликвоты эякулята (если необходимо провести анализ биохимических маркеров).

2.2.2.2 В пределах 3 часов после сбора эякулята

- Определите концентрацию сперматозоидов (может быть выполнено позднее, желательно в тот же день).
- Отправьте образцы в микробиологическую лабораторию (при необходимости).



2.2.2.3 Позднее, в тот же или на следующий день

- Окрасьте мазки и проведите морфологическую оценку сперматозоидов.
- Выполните биохимический анализ маркеров добавочных желез (при необходимости).

2.2.3 Последующие процедуры

- Расчеты.
- Представление результатов.
- Утверждение результатов для выдачи.

2.3 Процедуры, предшествующие исследованию

В этом разделе описаны все необходимые шаги, которые необходимо предпринять до исследования.

2.3.1 Информирование пациента

- Мужчина должен получить четкие письменные и устные указания относительно сбора образца эякулята. Врач должен предоставить пациенту такую же информацию.
- Основная рекомендация касается сбора эякулята путем мастурбации.
 - Прерываемый коитус не рекомендуется и должен применяться только в исключительных случаях из-за риска неполного сбора и загрязнения влагалищным отделяемым и клетками.
 - В исключительных обстоятельствах альтернативным вариантом могут быть специальные презервативы для исследования фертильности, но в этом случае для исследования не будет доступен весь эякулят, и образец, вероятно, будет загрязнен в результате контакта с кожей пениса и в некоторой мере с влагалищным отделяемым и клетками на внешней стороне презерватива. Противозачаточные презервативы не могут быть использованы из-за наличия в них спермицидных веществ. Обычные латексные презервативы не должны использоваться для сбора эякулята, поскольку они содержат вещества, препятствующие подвижности сперматозоидов (47).
 - Следует избегать использования лубрикантов, поскольку они могут загрязнить эякулят и изменить его параметры. При крайней необходимости следует использовать проверенные не токсичные для сперматозоидов лубриканты.
- Эякулят должен быть собран полностью, и мужчина должен сообщить о любых потерях какой-либо части образца.
- Эякулят должен быть собран минимум через 2 дня и максимум через 7 дней воздержания от эякуляции.

- Во избежание воздействия колебаний температуры на эякулят и для соблюдения временного интервала между сбором и исследованием образец рекомендуется собрать в отдельной комнате рядом с лабораторией. В идеале исследование должно начаться в течение 30 минут после сбора, но не позднее чем в течение 60 минут.
 - В отдельных случаях могут потребоваться исключения, и каждый мужчина должен быть надлежащим образом проконсультирован в отношении возможностей и рисков.
 - В случае если образец собран не в непосредственной близости от лаборатории, его следует транспортировать при температуре не ниже 20°C и не выше 37°C.
 - Если пациент по какой-либо причине должен собрать эякулят в другом месте, то ему следует держать контейнер с образцом во время транспортировки близко к телу под одеждой, например в подмышечной впадине, и доставить его в лабораторию предпочтительно в течение 30 минут после сбора, но не позднее чем через 50 минут после сбора.

2.3.2 Сбор образца

- Перед сбором эякулята контейнер для образца следует держать при температуре окружающей среды, от 20°C до 37°C, с тем чтобы избежать сильных перепадов температуры, которые могут повлиять на сперматозоиды.
- Для образца следует предусмотреть чистый контейнер с широким горлом, изготовленный из пластика и принадлежащий к партии, которая была подтверждена как нетоксичная для сперматозоидов (**раздел 2.5.10 на стр. 76**).
- Контейнер с образцом, а также соответствующие рабочие листы должны быть снабжены идентификаторами, которые в сочетании с процедурами получения образца и дальнейшей обработки исключают риск путаницы образцов и рабочих листов. Правовые требования к опознавательным знакам контейнеров могут различаться. Это могут быть имя и фамилия мужчины и его идентификационный номер, дата и время сбора или уникальный идентификационный номер образца.
- Следующая информация должна быть зарегистрирована при получении образца и представлена в окончательном отчете (**раздел 8.5 на стр. 270**):
 - личная информация о мужчине (например, имя, фамилия, дата рождения и номер личного кода) и, в идеале, его подтверждение того, что образец принадлежит именно ему;
 - предшествующий период воздержания от эякуляции;
 - дата и время сбора эякулята;
 - полнота образца и любые трудности со сбором образца (например, если сбор был произведен не в лаборатории); и
 - объем эякулята.

- В некоторых конкретных ситуациях применяются особые условия:
 - стерильный сбор эякулята для вспомогательных репродуктивных технологий (**раздел 2.5.11 на стр. 76**);
 - стерильный сбор эякулята для микробиологического анализа (**раздел 2.5.12 на стр. 77**).

2.3.3 Первичная обработка образца

- Собранный эякулят следует без излишней задержки довести до жидкого состояния, желательно в инкубаторе при температуре 37°C, и, если возможно, на орбитальной платформе для смешивания в целях содействия разжижению и перемешиванию образца.
- Время между сбором и началом исследования эякулята должно быть зарегистрировано в начале макроскопической оценки и представлено в заключительном отчете. Оценка предпочтительно начинать в течение 30 минут и не более чем через 60 минут после сбора образца.
- Длительное воздействие разжиженной жидкости эякулята *in vitro* влияет на такие параметры, как подвижность и морфология.
- Эякулят может содержать возбудителей опасных инфекционных заболеваний (например, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусы гепатита или вирус простого герпеса), поэтому с ним следует обращаться как с биологически опасным веществом. Необходимо строго соблюдать правила техники безопасности, изложенные в **разделе 8.2 на стр. 249** в основе безопасности лаборатории лежит надлежащая лабораторная практика (48).

2.4 Процедуры исследования и последующие процедуры

2.4.1 Оценка объема эякулята

При любой оценке эякулята необходимо точное измерение его объема, поскольку он дает информацию о секреторных функциях добавочных половых желез. Надежная оценка объема эякулята необходима также для подсчета общего числа сперматозоидов, общего числа клеток, не относящихся к сперматозоидам, в эякуляте и общего количества биохимических маркеров.

2.4.1.1 Измерение объема путем взвешивания

Объем лучше всего измерять путем взвешивания образца в контейнере, в котором он был собран. Это предпочтительно делать при получении контейнера с эякулятом до его помещения в инкубатор для разжижения. Другие методы приводят к менее точным результатам (Cooper et al., 2007).

1. Для сбора эякулята используйте предварительно взвешенный контейнер с указанием веса на контейнере и крышке.



- Пустые контейнеры для образцов обычно имеют разный вес, поэтому необходимо предварительно взвешивать каждый контейнер с крышкой. Вес следует записать несмываемым маркером на контейнере и его крышке до того, как он будет передан пациенту. При использовании этикеток, например для идентификаторов, их вес должен быть включен в вес пустого контейнера. Стерильные контейнеры в этих целях открывать не следует.

2. Взвесьте контейнер с собранным эякулятом.

3. Вычтите вес контейнера.

4. Рассчитайте объем эякулята, исходя из веса образца с учетом того, что плотность эякулята составляет 1 г/мл (Auger et al., 1995). (По имеющимся данным, плотность эякулята варьируется между 1,03 и 1,04 г/мл (49), 1,00 и 1,01 г/мл (50) и в среднем составляет 1,01 г/мл (51)).

2.4.2 Макроскопическая оценка

Макроскопическая оценка включает ряд важных наблюдений, которые, возможно, не поддаются оценке в точных численных значениях, то есть измерению традиционными количественными методами, но при этом могут иметь большое клиническое значение.

2.4.2.1 Макроскопический вид эякулята

В норме разжиженный эякулят макроскопически однороден и имеет кремовый/серый опалесцирующий цвет. При очень низкой концентрации сперматозоидов он может казаться более прозрачным; цвет также может быть другим – например, слегка желтоватым после более длительного воздержания, красно-коричневым при наличии эритроцитов (гемоспермия) или более желтым у пациента с желтухой или мужчины, принимающего некоторые витамины или лекарственные препараты. Если эякулят выглядит вязким, совершенно прозрачным и бесцветным, то это может быть предэякулят, выделяемый только куперовыми железами, который вырабатывается у мужчин в разном количестве во время возбуждения; в таком случае это следует обсудить с пациентом, чтобы установить, произошла ли эякуляция, связанная с оргазмом.

2.4.2.2 Разжижение

Сразу же после эякуляции в контейнер для сбора эякулят обычно представляет собой полутвердую коагулированную массу или гелеобразный комочек. При комнатной температуре эякулят начинает разжижаться (становится водянистым), как правило, в течение нескольких минут, и к этому времени в жидкости можно увидеть неоднородную смесь полутвердых комочков. По мере дальнейшего разжижения эякулят становится более однородным и более водянистым, но все еще более вязким, чем вода. На последних стадиях разжижения остаются лишь небольшие области коагуляции.

Разжижению способствует температура 37°C. Кроме того, завершению разжижения способствует медленное вращательное движение контейнера с образцом. Если во время разжижения подвижный лоток (орбитальный

смеситель) не используется, то перед проведением макроскопической оценки разжижения необходимо медленно вращать контейнер в течение 15–30 секунд. Полное разжижение эякулята при комнатной температуре обычно достигается в течение 15–30 минут.

- Если в течение 30 минут полного разжижения не произошло, это следует зафиксировать и отметить в заключительном отчете. Затем эякулят можно оставить при температуре 37°C еще на 30 минут.
- Если разжижение не завершится через 60 минут, это также должно быть отражено в заключительном отчете.
- В норме разжиженный эякулят может содержать некоторое количество желеобразных гранул (желатиновых телец), которые не разжижаются и не имеют какого-либо клинического значения. Вместе с тем наличие тяжелой слизи может затруднить исследование эякулята и поэтому должно быть отмечено в заключительном отчете.

Более подробная информация о **проблемах разжижения** представлена в последней части этой главы.

2.4.2.3 Вязкость эякулята

Для оценки вязкости эякулята после разжижения следует аккуратно набрать его в одноразовую пластиковую пипетку с широким отверстием (диаметром около 1,5 мм) (проверенную на нетоксичность для эякулята и, при необходимости, стерильную) и затем наблюдать за длиной формирующихся нитей по мере его вытекания из пипетки в виде капель под действием силы тяжести.

В норме разжиженный эякулят вытекает из пипетки небольшими отдельными каплями. При аномальной вязкости капля образует нить длиной более 2 см.

2.4.2.4 Запах эякулята

Существует значительная вариабельность в способности разных людей воспринимать нормальный запах эякулята человека (45). Информация о сильном запахе мочи или гниения может иметь клиническое значение; поэтому это важно отметить в отчете.

2.4.2.5 pH эякулята

pH при эякуляции зависит от относительного вклада кислого секрета предстательной железы и щелочного секрета семенных пузырьков. Эффективных механизмов контроля pH жидкости в эякуляте нет. In vitro содержание CO₂ непрерывно снижается, что приводит к постепенному повышению pH. Клинический интерес представляет низкое значение pH эякулята. Если необходимо оценить pH, то это следует делать в одно и то же время, предпочтительно через 30 минут после сбора образца, но в любом случае в течение 1 часа после эякуляции.

В норме для измерения pH следует использовать тест-полоски с диапазоном значений от 6,0 до 10,0.

1. Тщательно перемешайте эякулят.
2. Равномерно нанесите каплю эякулята на полоску для измерения pH.
3. Подождите, пока цвет пропитанной зоны станет однородным (менее 30 секунд).
4. Сравните цвет с калибровочной шкалой и оцените pH.

Значение pH ниже 7,2 может свидетельствовать о недостатке щелочной жидкости семенных пузырьков. Это также может быть связано с загрязнением мочой.

2.4.3 Подготовка для микроскопического исследования

Для получения надежных результатов микроскопического исследования необходимо, чтобы исследуемые аликвоты были репрезентативными для всего эякулята. Свойства разжиженного эякулята, который все еще является более вязким, чем вода, значительно затрудняют взятие репрезентативного образца для исследования. Если образец плохо перемешан, исследование двух отдельных аликвот вряд ли будет репрезентативным для всего эякулята и может показать заметные различия в концентрации, подвижности, жизнеспособности и морфологии сперматозоидов. Даже если разжиженный эякулят макроскопически однороден, небольшие аликвоты могут иметь значительно отличающийся друг от друга состав.

2.4.3.1 Перемешивание эякулята

Перед взятием аликвоты эякулята для любой оценки тщательно перемешайте образец в контейнере, но не настолько энергично, чтобы образовались пузырьки воздуха. Перемешивания можно добиться, поместив контейнер с образцом на подвижный лоток во время разжижения в инкубаторе при температуре 37°C. При отсутствии орбитального смесителя базовое перемешивание может быть достигнуто путем ручного вращения в течение примерно 15–30 секунд (**раздел 2.4.2.2 на стр. 19**).

2.4.3.2 Репрезентативная выборка

Хотя макроскопически разжиженный эякулят может выглядеть совершенно однородным, его отдельные небольшие части все еще могут иметь значительно отличающийся друг от друга состав семенной жидкости и секретов. Поэтому необходимо:

- для оценки концентрации сперматозоидов использовать повторные аликвоты для разведения объемом не менее 50 мкл;
- для оценки подвижности сперматозоидов использовать повторные аликвоты объемом не менее 10 мкл.

Сопоставление таких повторных аликвот необходимо для снижения риска ошибок, обусловленных нерепрезентативной выборкой. Методы сопоставления приводятся в рамках описания каждой методики оценки.

2.4.3.3 Подготовка влажного препарата

Сразу после надлежащего перемешивания эякулята (раздел 2.4.3.1) отберите соответствующий объем, не позволяя сперматозоидам осесть в суспензии. Перед взятием повторных аликвот эякулята всегда снова перемешивайте образец. Повторные оценки подвижности должны проводиться с использованием двух разных свежеприготовленных влажных препаратов (справочную информацию см. в разделе **Принципы приготовления влажного препарата на стр. 73**).

1. Поместите 10 мкл тщательно перемешанной аликвоты на чистое предметное стекло микроскопа, которое желательно предварительно нагреть до 37°C (например, в инкубаторе для образцов).

- Следите за тем, чтобы между покровным и предметным стеклом не образовывались и не задерживались пузырьки воздуха.

2. Наложите покровное стекло размером 22 мм × 22 мм, осторожно опустив его горизонтально на каплю. Под тяжестью покровного стекла образец равномерно распределится (поэтому используйте покровное стекло весом #1½).

3. Оцените свежеприготовленный влажный препарат, как только его содержимое перестанет растекаться.

- Если содержимое не перестанет растекаться в течение 1 минуты после наложения покровного стекла, необходимо приготовить новый влажный препарат.

2.4.4 Оценка под микроскопом

Для всех исследований неокрашенных препаратов свежего эякулята необходим световой микроскоп, оснащенный фазово-контрастной оптикой (о том, как настраивать микроскоп, см. **раздел 8.3 на стр. 257**).

2.4.4.1 Низкое увеличение

Первичное микроскопическое исследование аликвот эякулята включает исследование препарата при совокупном увеличении ×100 (т.е. объектив ×10 в сочетании с окуляром ×10).

Это позволяет получить общее представление об образце и выявить равномерность распределения сперматозоидов в препарате, наличие видимых тяжелей слизи, а также агрегацию или агглютинацию сперматозоидов. В случае неравномерного распределения причина может быть следующей:

- недостаточное перемешивание;
- высокая вязкость;



- недостаточное разжижение;
- агрегация сперматозоидов.

2.4.4.2 Высокое увеличение

Затем препарат следует оценить при совокупном увеличении $\times 200$ или $\times 400$ (т.е. объектив $\times 20$ или $\times 40$ в сочетании с окуляром $\times 10$). Это позволяет:

- оценить подвижность сперматозоидов;
- определить степень разведения, необходимую для точной оценки числа сперматозоидов (раздел 2.4.4.3);
- определить наличие округлых клеток, требующих дальнейшей оценки;
- определить наличие клеток, отличных от сперматозоидов (например, эпителиальных клеток), или «округлых клеток» (лейкоцитов и незрелых половых клеток).

2.4.4.3 Оценка надлежащего разведения для подсчета сперматозоидов

Разведение эякулята, необходимое для точного измерения концентрации сперматозоидов, оценивается по числу сперматозоидов, наблюдаемых во всем поле зрения микроскопа при высоком увеличении. Необходимо использовать не менее 50 мкл тщательно перемешанного эякулята, а общий объем суспензии сперматозоидов должен составлять не менее 200 мкл. Расчет площади поля приводится в **разделе 2.5.9 на стр. 76**).

Если сперматозоиды не обнаруживаются, исследуйте другой влажный препарат. Если во втором препарате сперматозоиды также не обнаруживаются, действуйте согласно **разделу 2.4.8.8 на стр. 41**. Для обеспечения использования достаточных объемов эякулята и получения конечных объемов разведенных суспензий сперматозоидов для соответствующей обработки была разработана таблица 2.1.

Таблица 2.1 Достаточные объемы эякулята – конечные объемы разведенных суспензий сперматозоидов для соответствующей обработки

Число сперматозоидов в поле зрения при увеличении $\times 400$	Число сперматозоидов в поле зрения при увеличении $\times 200$	Разведение	Эякулят (в мкл)	Фиксатор (в мкл)
> 200	> 800	1 : 50 (1 + 49)	50	2 450
40–200	160–800	1 : 20 (1 + 19)	50	950
16–40	64–160	1 : 10 (1+ 9)	50	450
2–15	8–64	1 : 5 (1 + 4)	50	200
< 2	< 8	1 : 2 (1 + 1)	100	100

2.4.4.4 Фиксатор для разведения аликвот эякулята

Приготовьте, например, 1 л водного раствора, содержащего 0,595 моля бикарбоната натрия и примерно 0,14 моля формалина (формалином называется любой жидкий раствор формальдегида). Конечная концентрация формалина составляет одну десятую от той, которая используется в лабораториях, исследующих патологию и цитологию. По сравнению с ситуацией в таких лабораториях испарение формалина из препаратов в счетной камере крайне незначительно. При обращении с формалином необходимо выполнять установленные на местах правила, а работа в вытяжном шкафу будет обязательной, скорее всего, только при приготовлении исходных растворов низкой концентрации.

1. Растворите 50 г бикарбоната натрия (NaHCO_3) примерно в 500 мл дистиллированной воды, добавьте 10 мл 36–40%-ного раствора формальдегида и долейте воду до получения конечного объема 1000 мл.
2. При желании добавьте 0,25 г трипанового синего (цветовой индекс 23859) или 5 мл насыщенного (более 4 мг/мл) генцианвиолета (цветовой индекс 42555) для выделения головок сперматозоидов и облегчения надлежащей загрузки счетных камер.
3. Храните при температуре 2–8°C до 12 месяцев. Если в растворе образуются кристаллы, то перед использованием пропустите его через фильтр 0,45 мкм.

2.4.4.5 Разведение для оценки числа сперматозоидов

Разведение фиксатором необходимо для иммобилизации сперматозоидов. Подсчитать точное число неподвижных сперматозоидов гораздо легче по сравнению с подвижными. Кроме того, разведение важно при приготовлении более разжиженного образца для обеспечения более надежной загрузки в гемоцитометр. В целях обеспечения надежной репрезентативности и достаточного объема суспензии для тщательного перемешивания образца следует перемешать не менее 50 мкл эякулята с раствором разбавителя (после фиксации возможно вихревое перемешивание). Надлежащее разведение оценивается при первичном микроскопическом исследовании.

1. С помощью пипетки с вытеснением воздуха распределите соответствующее количество фиксатора в две пробирки для разведения.
2. Тщательно перемешайте образец эякулята, не допуская образования пузырьков.
3. С помощью пипетки с прямым вытеснением возьмите точный объем эякулята для разведения.
4. Оботрите внешнюю сторону наконечника пипетки, стараясь не касаться отверстия наконечника. Убедитесь в том, что в наконечнике пипетки нет пузырьков воздуха.
5. Выпустите эякулят из пипетки в фиксатор и ополосните ее наконечник путем втягивания и выпуска фиксатора. Извлеките наконечник пипетки с полностью нажатым поршнем и незамедлительно перемешайте разведенный

препарат вихревым способом для снижения риска образования видимых осадков, которые могут сделать оценку ненадежной.

6. Снова тщательно перемешайте образец эякулята и приготовьте новый разведенный препарат, следуя вышеописанным шагам.

2.4.4.6 Оценка слипания сперматозоидов

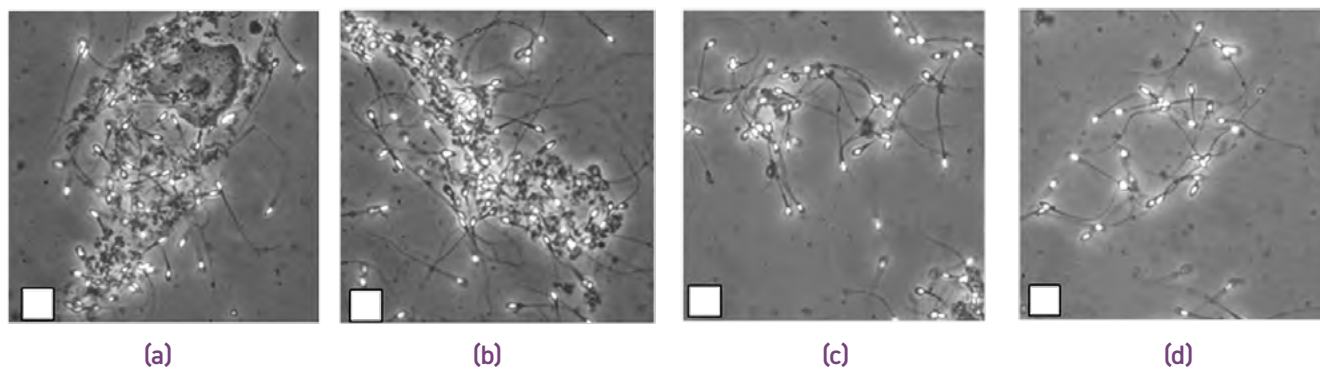
Существует два разных типа слипания сперматозоидов, которые необходимо оценивать отдельно.

Агрегация сперматозоидов

Слипание либо неподвижных сперматозоидов друг с другом, либо подвижных сперматозоидов стяжками слизи, клетками, не относящимися к сперматозоидам, или дебрисом определяется как неспецифическая агрегация (рис. 2.1).

Рис. 2.1 Неспецифическая агрегация сперматозоидов в эякуляте

Вид сперматозоидов, агрегированных с эпителиальной клеткой (a), дебрисом (b) или сперматозоидами (c, d).



Микрофотографии любезно предоставил К. Брэзил.

Агглютинация сперматозоидов

Агглютинация относится только к подвижным сперматозоидам, которые слипаются друг с другом «головка-в-головку», «хвост-в-хвост» или смешанным образом. Подвижность сперматозоидов часто бывает интенсивной, с ярко выраженными дрожательными движениями, но иногда сперматозоиды бывают настолько агглютинированы, что их подвижность довольно ограничена. Следует отмечать любые подвижные сперматозоиды, прилипшие друг к другу головками, хвостами или средней частью. Подвижные сперматозоиды, прилипшие к клеткам или дебрису, или неподвижные сперматозоиды, прилипшие друг к другу (агрегация), не должны оцениваться как агглютинация.

Основной тип агглютинации (отражающий степень и место прикрепления) должен быть зарегистрирован (52) (рис. 2.2).

Рис. 2.2 Схематическое изображение разных степеней агглютинации сперматозоидов

Затронутые части сперматозоидов	Степень агглютинации			
	1. Изолированная (менее 10 сперматозоидов на агглютинат, большинство сперматозоидов свободны)	2. Умеренная (10–50 сперматозоидов на агглютинат, имеются свободные сперматозоиды)	3. Значительная (более 50 сперматозоидов на агглютинат, некоторые сперматозоиды остаются свободными)	4. Тяжелая (все сперматозоиды агглютинированы, а агглютинаты взаимосвязаны)
А. «Головка-в-головку»				
В. «Хвост-в-хвост», при этом головки сперматозоидов остаются свободными и двигаются в сторону от агглютинатов				
С. «Кончик хвоста-в-кончик хвоста»				
Д. Смешанная агглютинация («голова-в-головку» и «хвост-в-хвост»)				
Е. Беспорядочная агглютинация (головки и хвосты спутаны. Головки не свободны от агглютинатов, как это наблюдается при агглютинации «хвост-в-хвост»)				

Перепечатано с разрешения Роуз и др. (1976 г.).

2.4.5 Клеточные элементы, не относящиеся к сперматозоидам

Эякулят содержит другие клетки, не относящиеся к сперматозоидам, некоторые из которых могут иметь клиническое значение. К ним относятся эпителиальные клетки мочеполовой системы, а также лейкоциты и незрелые половые клетки (последние два типа клеток называют «округлыми клетками») (53). Вместе с тем отличить лейкоциты от незрелых половых клеток с высокой степенью

достоверности в рамках исследования окрашенного мазка при увеличении $\times 1000$ невозможно (54) (см. **рис. 2.16 на стр. 71**, **рис. 2.17 на стр. 80** и **раздел 3.7 на стр. 134**). Другие методы выявления активных воспалительных клеток описаны в **разделе 3.5 на стр. 131**. Клиническая значимость этих тестов неясна, поэтому доказательных пределов не существует (55-57). См. также **раздел 2.4.8 на стр. 33**.

2.4.6 Подвижность сперматозоидов

Степень прогрессивной подвижности сперматозоидов связана с частотой наступления беременности (58-60). Общее число прогрессивно подвижных сперматозоидов в эякуляте имеет биологическое значение. Его получают путем умножения общего числа сперматозоидов в эякуляте на процентную долю прогрессивно подвижных клеток. Методы оценки подвижности с помощью компьютерного анализа эякулята (CASA) описаны в **разделе 4.5.1 на стр. 175**.

Если разжижение эякулята достигается в течение 30 минут, следует сразу же приступить к исследованию. В случае неполного разжижения через 30 минут эякулят можно оставить в инкубаторе при температуре 37°C еще на 30 минут, и затем следует начинать исследование. Информация о задержке или невозможности разжижения должна быть отмечена в отчете.

Скорость движения подвижных сперматозоидов зависит от температуры. Поэтому крайне важно стандартизировать температуру во время оценки подвижности. Как правило, проще всего поддерживать температуру, близкую к температуре тела, но для этого необходим микроскоп, оснащенный предметным столиком с регулируемой температурой, что позволит предварительно нагреть предметные и покровные стекла микроскопа, а также образец перед оценкой до 37°C . Это можно легко осуществить в случае, когда образец разжижается в инкубаторе при температуре 37°C . Использование комнатной температуры более проблематично, и это не в последнюю очередь связано с тем, что понятие комнатной температуры не определено, и поэтому она может существенно варьироваться.

Рекомендуется использовать окулярную сетку (**рис. 2.3 на стр. 30**), которая позволит легко ограничить оцениваемую область. Это особенно важно при исследовании образцов с большим числом сперматозоидов в каждом поле.

- Всегда начинайте с визуального просмотра нескольких полей без подсчета для получения представления о том, насколько хорошо распределены сперматозоиды. Это может быть сделано при более низком увеличении (общее увеличение $100\text{--}200\times$).
- Избегайте оценки участков, расположенных близко (менее 5 мм) к краю покровного стекла, с тем чтобы предотвратить связанные с высыханием артефакты, оказывающие воздействие на оценку подвижности.
- Выбор полей должен быть случайным; избегайте выбирать поля на основе количества увиденных сперматозоидов.
- Исследуйте предметное стекло последовательно во избежание повторного просмотра одного и того же участка. Необходимо оценить не менее 5 различных полей даже в том случае, когда более 200 сперматозоидов было подсчитано менее чем в 5 полях.

- Начните подсчет в том или ином поле в случайный момент (не ждите, пока сперматозоиды заплывут в это поле или участок сетки, чтобы начать подсчет).
- Оцените подвижность всех сперматозоидов в определенной области поля. Выбирайте часть поля или сетки для оценки в зависимости от концентрации сперматозоидов, т.е. при высокой концентрации сперматозоидов оценивайте только верхний ряд сетки, а при низкой – всю сетку.
- Во избежание завышенной оценки числа прогрессивно подвижных сперматозоидов считайте последовательно, начиная с быстрых и медленных прогрессивно подвижных сперматозоидов. Цель состоит в том, чтобы незамедлительно подсчитать все прогрессивно подвижные сперматозоиды в данном участке сетки; избегайте также подсчета тех сперматозоидов, которые заплывают в данный участок сетки во время подсчета. Во время второго подсчета подсчитываются непрогрессивно подвижные и неподвижные сперматозоиды, которые остаются в пределах данного участка сетки.
- Оцените примерно 200 сперматозоидов в каждом препарате; каждый препарат – это отдельный свежеприготовленный влажный препарат.
 - Если число сперматозоидов достигнет 200 до того, как будут подсчитаны все категории подвижности в данной области, подсчет следует продолжать до тех пор, пока не будут подсчитаны все категории. Это необходимо для того, чтобы избежать смещения в сторону категории подвижных сперматозоидов, которые подсчитываются первыми.
- Сравните значения препаратов на предмет того, являются ли они приемлемо близкими. Если да, приступайте к расчетам; если нет, приготовьте новые образцы. Если три набора препаратов не дали приемлемо близких результатов, в качестве результата приводится среднее значение всех шести оценок с комментарием в отчете в отношении того, что результат является средним значением существенно различающихся оценок (что указывает на необычную степень неопределенности, которая может быть обусловлена неконгруэнтными аликвотами).
- Об устранении проблем при оценке подвижности см **раздел 7.10.3 на стр. 239**.

2.4.6.1 Категории подвижности сперматозоидов

Рекомендуется система градации подвижности по четырем категориям.

Клинические данные, полученные как при оценке подвижности сперматозоидов, выполненной лаборантом, так и при компьютерном анализе сперматозоидов, свидетельствуют о важности выявления быстрых прогрессивно подвижных сперматозоидов (12, 61-70). Поэтому рекомендованы следующие категории (с указанием приблизительных пределов скорости):

- быстрые прогрессивно подвижные (не менее 25 мкм/с) – сперматозоиды,двигающиеся активно, линейно или по кругу большого радиуса, преодолевающие расстояние (от начальной до конечной точки) не менее 25 мкм (или ½ длины хвоста) за одну секунду;

- медленные прогрессивно подвижные (от 5 до менее 25 мкм/с) – сперматозоиды, движущиеся активно, линейно или по кругу большого радиуса, преодолевающие расстояние (от начальной до конечной точки) от 5 до менее 25 мкм (или по меньшей мере от длины головки до менее ½ длины хвоста) за одну секунду;
- непрогрессивно подвижные (менее 5 мкм/с) – все другие виды активных движений хвоста с отсутствием прогрессии, т.е. плавание по кругу небольшого радиуса, при этом под воздействием жгутиковой силы головка смещается (от начальной до конечной точки) менее чем на 5 мкм (одна длина головки); и
- неподвижные – отсутствие активных движений хвоста.

2.4.6.2 Сравнение препаратов и расчеты результатов

- Рассчитайте доли (в %) четырех категорий подвижности отдельно для двух препаратов, а также доли прогрессивно подвижных и подвижных сперматозоидов.
- Затем рассчитайте среднее значение двух препаратов для доминирующей группы (неподвижных или подвижных сперматозоидов).
- Рассчитайте различие между оценками доминирующей группы в препаратах.
- Определите приемлемость различия по **таблице 2.2 на стр. 30** (максимальное различие между двумя процентными значениями, которое, как ожидается, может возникнуть в 95% образцов из-за случайных причин. Если различие превышает значение, указанное в таблице, то вероятность того, что оно обусловлено случайными причинами, составляет менее 5%).
- Если различие между процентными значениями приемлемо, укажите среднюю процентную долю каждой категории подвижности сперматозоидов: (a) быстрые прогрессивно подвижные; (b) медленные прогрессивно подвижные; (c) непрогрессивно подвижные; (d) неподвижные. Если различие слишком велико, возьмите две новые аликвоты из образца эякулята, приготовьте два новых препарата и повторите оценку. Если различие между препаратами превышает допустимое значение, оценку не следует повторять более двух раз. В качестве окончательного результата может быть указано среднее значение шести оценок вместе с комментарием в отношении того, что этот результат является неопределенным из-за высокой вариабельности оценок препаратов.
- Укажите среднюю процентную долю каждой категории подвижности, округленную до ближайшего целого числа.
- Сумма четырех оценок должна быть равна 100. Если она равна 99 или 101, значение доминирующей группы корректируется таким образом, чтобы получить сумму, равную 100. Если сумма не доходит до 99 или превышает 101, необходимо устранить ошибку, допущенную при подсчете или расчетах.

Рис. 2.3 Вспомогательные инструменты для оценки подвижности сперматозоидов

(а) Окулярная сетка облегчает подсчет подвижных и неподвижных сперматозоидов. (б) Систематический выбор полей для оценки подвижности сперматозоидов на расстоянии не менее 5 мм от краев покровного стекла.

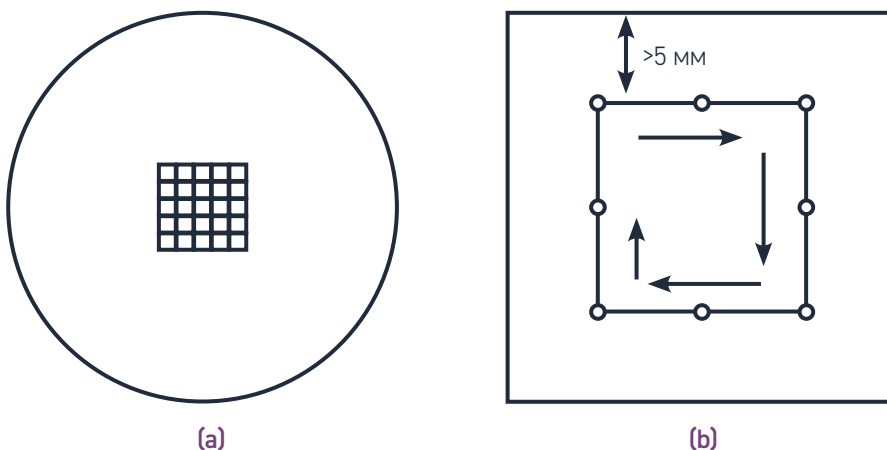


Таблица 2.2 Приемлемые различия (на основе 95%-ного доверительного интервала) между двумя процентными значениями для конкретного среднего значения, определенного на основе двойного подсчета 200 сперматозоидов (всего 400 подсчитанных сперматозоидов)

Среднее значение (в %)	1	2-3	4-6	7-9	10-13	14-19	20-27	28-44	45-55	56-72	73-80	81-86	87-90	91-93	94-96	97-98	99
Приемлемое различие	2	3	4	5	6	7	8	9	10	9	8	7	6	5	4	3	2

2.4.7 Жизнеспособность сперматозоидов

Жизнеспособность сперматозоидов, оцениваемая по целостности клеточной мембраны, может определяться в обычном порядке во всех образцах эякулята, но в случае, когда по меньшей мере 40% сперматозоидов подвижны, это не требуется. В образцах, содержащих сперматозоиды с плохой подвижностью, тест на жизнеспособность имеет важное значение для различения неподвижных мертвых сперматозоидов от неподвижных живых сперматозоидов. Наличие большого количества живых, но неподвижных клеток может свидетельствовать о структурных дефектах жгутика (71, 72); высокий процент неподвижных мертвых клеток может указывать на патологию придатка яичка (73, 74) или иммунологическую реакцию вследствие инфекции.

Процентная доля живых сперматозоидов оценивается путем выявления сперматозоидов с неповрежденной клеточной мембраной методом исключения красителя (мертвые клетки имеют поврежденную цитоплазматическую мембрану, которая позволяет проникать красителям, не способным к проникновению через мембрану) или путем проведения теста на гипотоническое набухание. Рекомендуемым тестом для диагностики является эозин-нигрозиновый тест. **Альтернативные тесты на жизнеспособность** описаны в конце этого раздела.

Жизнеспособность сперматозоидов следует оценивать как можно скорее после разжижения образца эякулята, предпочтительно через 30 минут, но в любом случае в течение 1 часа после эякуляции, с тем чтобы ограничить пагубное влияние обезвоживания или температурных колебаний на жизнеспособность сперматозоидов.

2.4.7.1 Тест на жизнеспособность сперматозоидов с использованием эозин-нигрозина

В рамках применения этого одноэтапного метода окрашивания используется нигрозин для увеличения контраста между фоном и головками сперматозоидов, что способствует их лучшему различению. Это также позволяет хранить предметные стекла для повторной оценки, обучения и контроля качества (75, 76).

Приготовление реагентов

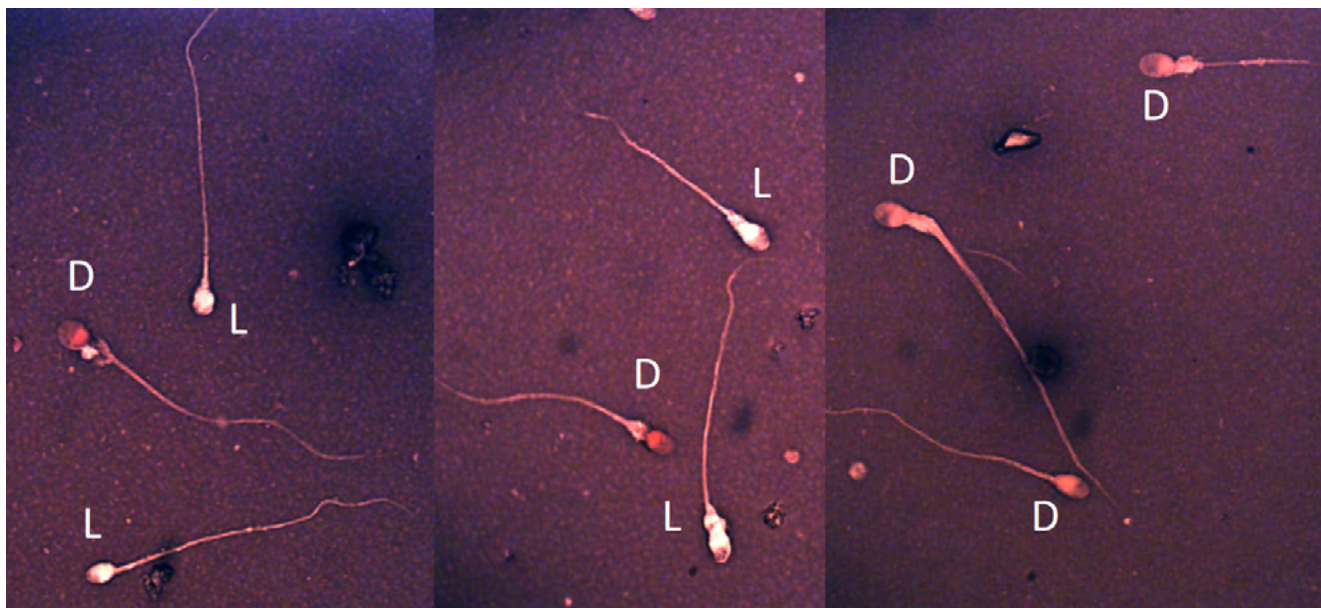
1. Эозин Y: растворите 0,67 г эозина Y (цветовой индекс 45380) и 0,9 г хлорида натрия (NaCl) в 100 мл очищенной воды при небольшом нагреве.
2. Эозин-нигрозин: добавьте 10 г нигрозина (цветовой индекс 50420) к 100 мл раствора эозина Y.
3. Доведите суспензию до кипения, затем дайте ей остыть до комнатной температуры.
4. Профильтруйте через фильтровальную бумагу (например, 90 г/м²) для удаления осадка и желатиновых включений и храните в герметичной бутылке из темного стекла.

Процедура

1. Тщательно перемешайте образец эякулята.
2. Отберите аликвоту эякулята объемом 50 мкл, смешайте с равным объемом суспензии эозин-нигрозина (например, в лунке фарфорового планшета или пробирке) и подождите 30 секунд.
3. Сделайте мазок на предметном стекле и дайте ему высохнуть на воздухе.
4. Исследуйте сразу после высыхания (с риском загрязнения объектива нигрозином) или позднее после заключения в стабильную неводную гистологическую среду.
5. Исследуйте предметное стекло под световым микроскопом при увеличении $\times 1000$ с использованием масляной иммерсии.
6. Подсчитайте число окрашенных (мертвых) или неокрашенных (живых) клеток с помощью лабораторного счетчика.
7. Оцените не менее 200 сперматозоидов, чтобы обеспечить приемлемо низкую ошибку выборки (77).
8. Об устранении проблем при оценке жизнеспособности сперматозоидов см. **раздел 7.10.4 на стр. 240.**

Рис. 2.4 Мазок, окрашенный эозин-нигрозин, под световым микроскопом

Сперматозоиды с красными и темно-розовыми головками считаются мертвыми (D), а сперматозоиды с белыми головками (L) – живыми.



Микрофотографию любезно предоставил Л. Бьёрндал.

Подсчет

1. Нигрозин обеспечивает темный фон, что облегчает различение бледно окрашенных сперматозоидов.
2. Под световым микроскопом живые сперматозоиды имеют белые головки, а головки мертвых сперматозоидов окрашены в красный или розовый цвет. Сперматозоиды с бледно-розовыми головками оцениваются как мертвые.
3. Если окрашивание ограничено только частью шейной области, а остальная часть головки не окрашена, это считается признаком «протекающей шейной мембраны», а не гибели клетки и полного разрушения мембраны. Такие клетки следует оценивать как живые.

2.4.7.2 Расчеты

1. Рассчитайте процентную долю живых клеток.
2. Укажите процентную долю жизнеспособных сперматозоидов, округленную до ближайшего целого числа.

2.4.7.3 Интерпретация результатов в отношении жизнеспособности сперматозоидов

Клинический интерес представляет информация об образцах с незначительным числом или отсутствием подвижных сперматозоидов.

- Определите долю живых неподвижных сперматозоидов.

- Вычитите долю подвижных сперматозоидов (сумма быстрых, медленных и непрогрессивно подвижных сперматозоидов) из доли живых сперматозоидов.
- Составляет ли доля живых неподвижных сперматозоидов более 25–30% от всех сперматозоидов? Точных предельных значений не существует, но, если более 25–30% всех сперматозоидов являются живыми и неподвижными, причиной может быть генетическая проблема с ресничной структурой, и в этом случае подвижность сперматозоидов вряд ли можно улучшить с помощью какого-либо медицинского лечения.

2.4.8 Подсчет сперматозоидов и других клеток

Общее число сперматозоидов в эякуляте и концентрация сперматозоидов связаны как со временем достижения беременности (78), так и с частотой наступления беременности (59, 79) и являются прогностическими факторами зачатия (60, 80). Вместе с тем необходимы дополнительные данные о корреляции общего числа сперматозоидов с репродуктивными результатами.

Число сперматозоидов в эякуляте рассчитывается на основе концентрации сперматозоидов и объема эякулята. В норме при отсутствии обструкции мужских половых путей и коротком времени воздержания число сперматозоидов в эякуляте коррелирует с объемом яичек (2, 32, 34, 81) и, таким образом, является мерой способности яичек производить сперматозоиды (82), проходимости мужских половых путей и, потенциально, количества сперматозоидов, передаваемых женщине во время полового акта.

Концентрация сперматозоидов в эякуляте, хотя и связана с оплодотворением и частотой наступления беременности, зависит от объема секретов семенных пузырьков и предстательной железы (83) и не является хорошим показателем функции яичек.

Термин «плотность сперматозоидов» (масса на единицу объема) не следует использовать, если имеется в виду концентрация сперматозоидов (число на единицу объема).

2.4.8.1 Обзор подсчета сперматозоидов

- Выберите наиболее подходящее разведение на основе исследования влажного препарата (раздел 2.4.4.3 на стр. 23).
- Приготовьте разведенные препараты, смешав точные объемы эякулята и фиксатора (таблица 2.1 на стр. 23; раздел 2.4.4.3 на стр. 23).
- Если аликвота эякулята объемом 50 мкл взята с помощью пипетки с прямым вытеснением и разведена надлежащим образом, необходимо сделать только одно разведение (84, 85). Повторные аликвоты из суспензии сперматозоидов необходимо исследовать и сравнить.
- Подготовьте счетную камеру (гемоцитометр).



- Загрузите камеру гемоцитометра и оставьте ее во влажном резервуаре, с тем чтобы сперматозоиды осели на дно счетной камеры.
- Оцените число сперматозоидов сразу после извлечения камеры из влажного резервуара (чтобы избежать негативного влияния испарения в счетной камере).
- Подсчитайте не менее 200 сперматозоидов в каждом препарате.
- Сравните подсчеты, чтобы убедиться в получении приемлемо близких значений. Если да, приступайте к расчетам; если нет, приготовьте новые разведенные препараты.
- Об устранении проблем при подсчете сперматозоидов см. **таблицу 7.14 на стр. 240**.
- Рассчитайте концентрацию сперматозоидов на мл.
- Рассчитайте число сперматозоидов в эякуляте.

2.4.8.2 Гемоцитометр с улучшенной сеткой Нейбауэра

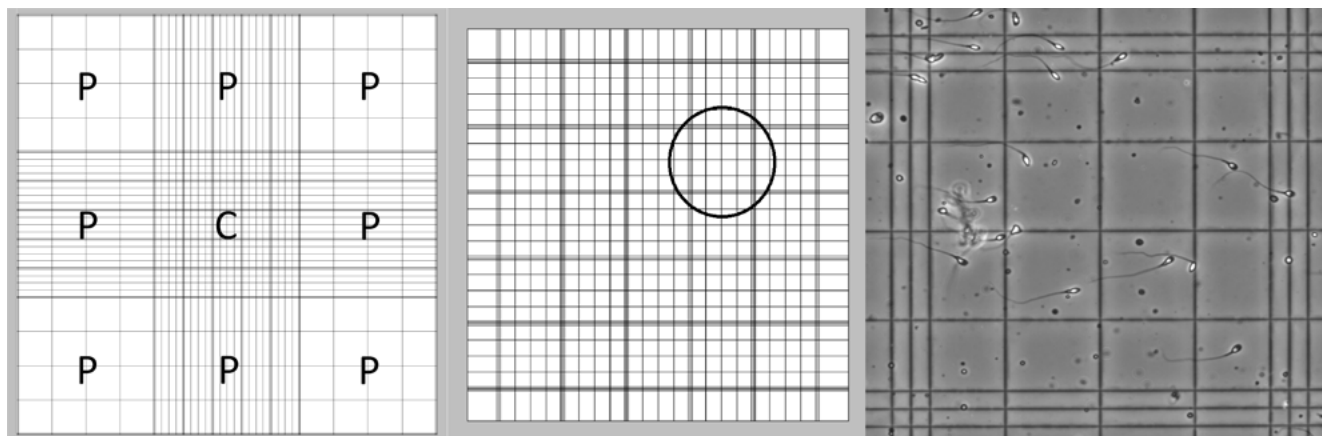
Рекомендуется использовать гемоцитометрические камеры с улучшенной сеткой Нейбауэра. Коэффициенты разведения для усовершенствованной гемоцитометрической камеры Нейбауэра приведены в **разделе 2.4.4.3 на стр. 23**. Можно использовать и другие гемоцитометрические камеры, но, если они имеют другую структуру и зоны сетки, потребуются другие коэффициенты расчета. Одноразовые гемоцитометры с сеткой Нейбауэра должны быть валидированы (86).

Усовершенствованный гемоцитометр Нейбауэра имеет две отдельные счетные камеры, в каждой из которых на стеклянную поверхность нанесена микроскопическая сетка размером 3 мм × 3 мм. Гемоцитометр используется со специальным толстым покровным стеклом (толщина #4, 0,44 мм), которое накрывает сетку и поддерживается стеклянными опорами, расположенными на высоте 0,1 мм (100 мкм) над дном камеры. Каждая зона подсчета разделена на девять квадратов размером 1 мм × 1 мм. Эти квадраты обозначаются номерами, как показано на рис. 2.5.

В зависимости от разведения и числа подсчитанных сперматозоидов для определения концентрации сперматозоидов используются различные зоны камеры. Как правило, для подсчета используется центральный квадрат. Восемь периферийных квадратов используются в том случае, если в центральном квадрате было подсчитано менее 200 сперматозоидов.

Рис. 2.5 Гемоцитометр с улучшенной сеткой Нейбауэра

На рисунке изображены все девять квадратов в одной камере гемоцитометра (*левая панель*): центральный квадрат (С) и восемь периферийных квадратов (Р). Центральный квадрат состоит из 25 больших клеток (*средняя панель*). Микрофотография части заполненной камеры (*правая панель*): одна из 25 клеток центрального квадрата (обведенная клетка на средней панели), ограниченная тройными линиями и содержащая 16 более мелких клеток. Восемь периферийных квадратов имеют тот же размер, что и центральный квадрат, но размеры и число меньших прямоугольников варьируются. При глубине 100 мкм каждый из девяти квадратов вмещает 100 нл.



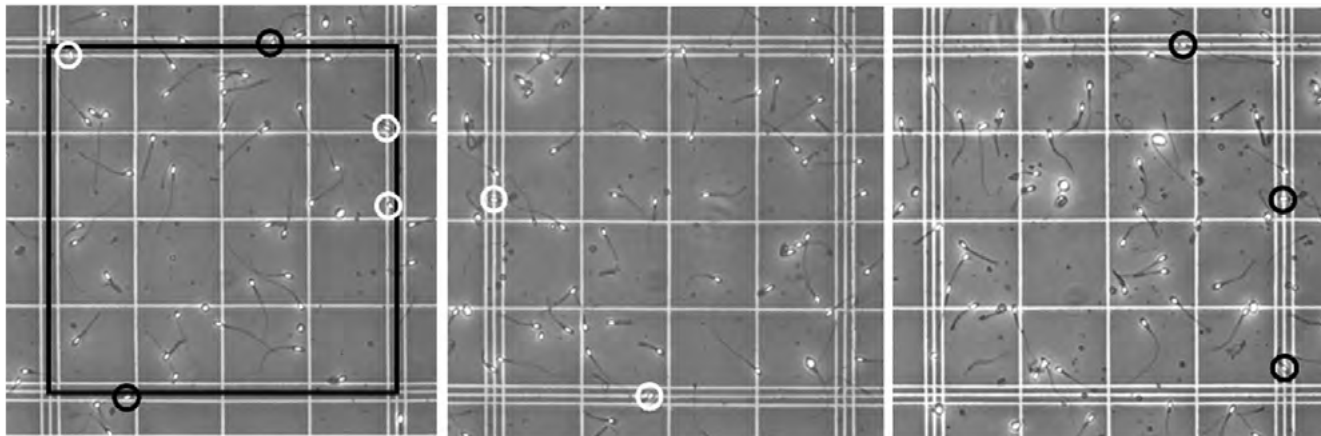
Графические изображения и микрофотографию любезно предоставил Л. Бьёрндал.

Принципы подсчета с помощью сетки гемоцитометра

- Подсчитывайте только целые сперматозоиды (с головкой и хвостом).
- Если имеется много хвостов сперматозоидов без головок (ацефалические сперматозоиды) или головок без хвостов, их наличие должно быть зафиксировано в отчете. Концентрацию можно оценить по отношению к целым сперматозоидам (например, «45 хвостов без головок на 100 сперматозоидов»).
- Если головки сперматозоидов с более чем одним хвостом встречаются чаще, чем один к пяти (20 на 100 подсчитанных сперматозоидов), следует указать относительную частоту.
- Границы больших клеток обозначаются средней из трех линий.
- То, следует ли подсчитывать тот или иной сперматозоид или нет, определяется по расположению его головки; ориентация хвоста не имеет значения.
 - Подсчитываются все сперматозоиды, не имеющие контакта с границами (средняя из трех линий) большой клетки (рис. 2.6, левая панель: сперматозоиды в белых окружностях подсчитываются).
 - Подсчитываются сперматозоиды, контактирующие только с нижней или левой границей, но не с верхней или правой границей (рис. 2.6, средняя панель: сперматозоиды в белых окружностях подсчитываются; правая панель: сперматозоиды в черных окружностях не подсчитываются).

Рис. 2.6 Какие сперматозоиды следует подсчитывать в клетках сетки?

Границу клетки определяет средняя из трех линий (черная линия, левая панель). Подсчитываются все сперматозоиды в пределах центральной клетки (белые окружности). Сперматозоиды, головка которых находится на средней линии, подсчитываются только в тех случаях, когда эта линия является нижней или левой границей клетки (белые окружности, средняя панель), и не подсчитываются, когда она является верхней или правой границей клетки (черные окружности, правая панель).



Микрофотографии любезно предоставил К. Брэзил.

2.4.8.3 Подготовка и загрузка камер гемоцитометра

1. Слегка увлажните поверхность крепления покровного стекла гемоцитометра («опоры камеры»).
2. Закрепите покровное стекло на счетных камерах, плотно прижав его к опорам камеры. Появление радужности (многочисленные кольца Ньютона) между двумя стеклянными поверхностями подтверждает правильность установки покровного стекла. Чем больше линий, тем лучше прилегание; наличие только одной или двух линий указывает на то, что стеклянные поверхности расположены недостаточно близко, что приведет к неправильной глубине камеры. Убедитесь, что покровное стекло надежно закреплено и не сдвинется при легком прикосновении кончиком пипетки.
3. Тщательно перемешайте первый разведенный препарат вихревым способом на высокой скорости в течение 15 секунд. Во избежание оседания сперматозоидов незамедлительно отберите объем фиксированной суспензии, достаточный для заполнения всей площади под покровным стеклом над одной счетной камерой (обычно около 10 мкл).
4. Осторожно прикоснитесь кончиком пипетки к краю покровного стекла этой камеры.
5. Медленно нажимая на поршень пипетки, заполняйте камеру под действием капиллярных сил. Покровное стекло не следует передвигать во время заполнения, а камеру не следует переполнять или заполнять не полностью (когда часть площади камеры занимает воздух).

6. Перемешайте второй разведенный препарат, как указано выше, и сразу же отберите вторую аликвоту. Загрузите вторую камеру гемоцитометра, выполнив описанные выше действия.

7. Для предотвращения высыхания оставьте гемоцитометр в горизонтальном положении при комнатной температуре во влажном резервуаре (например, на влажной фильтровальной бумаге в закрытой чашке Петри) не менее чем на 10–15 минут (для полного осаждения сперматозоидов в камере глубиной 100 мкм).

2.4.8.4 Оценка числа сперматозоидов в счетных камерах

Число сперматозоидов следует оценивать в обеих камерах гемоцитометра. Если эти два значения в достаточной степени близки, то взятые аликвоты можно считать репрезентативными для образца (**раздел 2.4.3.2 на стр. 21**). Важно помнить, что отсутствие сперматозоидов в исследуемой аликвоте необязательно означает их отсутствие в остальной части эякулята.

1. Исследуйте гемоцитометр под фазово-контрастным микроскопом при увеличении $\times 200$ (или $\times 400$, если позволяет оптика микроскопа).

2. Чтобы ошибка выборки была приемлемо низкой, необходимо подсчитать не менее 200 сперматозоидов в каждом препарате.

3. Сначала оцените левую верхнюю большую клетку в центральном квадрате одной стороны усовершенствованной камеры Нейбауэра. Используйте полученное число, чтобы определить, сколько больших клеток в центральном квадрате необходимо оценить:

- менее 10 сперматозоидов: подсчитать во всем центральном квадрате (в 25 больших клетках)
- 10–40 сперматозоидов: подсчитать в 10 больших клетках
- более 40 сперматозоидов: подсчитать в 5 клетках (например, в 4 угловых и центральной)



Примечание. Если в заранее определенном числе больших клеток подсчитано менее 200 сперматозоидов, продолжите подсчет до следующего указанного выше числа больших клеток. Если во всех 25 больших клетках центрального квадрата число подсчитанных сперматозоидов не достигнет 200, рассмотрите возможность подсчета в периферийных квадратах 1–8 (рис. 2.5).

4. Отметьте число крупных клеток или квадратов, которые были оценены в процессе подсчета не менее 200 сперматозоидов. В другой камере гемоцитометра сперматозоиды должны быть подсчитаны в таком же числе крупных клеток или квадратов.

5. Подсчитайте число сперматозоидов с помощью лабораторного счетчика.

6. Перейдите ко второй камере гемоцитометра и выполните повторный подсчет в том же числе клеток или квадратов, что и в первой камере, даже если будет подсчитано менее 200 сперматозоидов.

7. Рассчитайте сумму и разность двух чисел.

8. Определите, является ли различие между последовательно подсчитанными числами приемлемым в соответствии с разделом 2.4.8.5.

- Если различие приемлемо, рассчитайте концентрацию (**раздел 2.4.8.6 на стр. 40**) и общее число сперматозоидов в эякуляте (**раздел 2.4.8.7 на стр. 41**).

- Если различие слишком велико:

- Сначала загрузите повторно разведенные препараты в новый гемоцитометр и произведите подсчет. Если различие все еще слишком велико, произведите подсчет в третий раз.

- Если после трех подсчетов различие все еще слишком велико, рассчитывается среднее значение по всем подсчетам, и в окончательном отчете дается комментарий в отношении повышенной неопределенности результата.

2.4.8.5 Сравнение различий между подсчитанными числами в препаратах

Определите, какая строка в столбце с диапазоном сумм соответствует вашему числу подсчитанных сперматозоидов. Если различие между подсчитанными вами числами меньше предельного значения для различий в столбце справа от диапазона сумм или равно ему, вы можете принять оценки препаратов и рассчитать окончательный результат.

Третий столбец дает представление о степени неопределенности окончательного результата на основе числа наблюдений (число оцененных сперматозоидов). При небольшом числе наблюдений повторные подсчеты могут быть приняты с меньшим различием, но из-за ограниченного числа наблюдений окончательный результат все равно будет менее определенным (**см. раздел 8.6 на стр. 272**).

Таблица 2.3 Сравнение различий между результатами подсчета и связь со степенью неопределенности результата

Диапазон сумм	Предельное различие	Ошибка при расчетах окончательного результата в зависимости от числа наблюдений
969-1000	61	3,2%
938-968	60	3,3%
907-937	59	3,3%
876-906	58	3,4%
846-875	57	3,4%
817-845	56	3,5%
788-816	55	3,6%
760-787	54	3,6%
732-759	53	3,7%
704-731	52	3,8%
678-703	51	3,8%
651-677	50	3,9%
625-650	49	4,0%
600-624	48	4,1%
576-599	47	4,2%
551-575	46	4,3%
528-550	45	4,4%
504-527	44	4,5%
482-503	43	4,6%
460-481	42	4,7%
438-459	41	4,8%
417-437	40	4,9%
396-416	39	5,0%
376-395	38	5,2%
357-375	37	5,3%
338-356	36	5,4%
319-337	35	5,6%
301-318	34	5,8%
284-300	33	5,9%
267-283	32	6,1%
251-266	31	6,3%
235-250	30	6,5%
219-234	29	6,8%
206-218	28	7,0%
190-205	27	7,3%
176-189	26	7,5%

Диапазон сумм	Предельное различие	Ошибка при расчетах окончательного результата в зависимости от числа наблюдений
163–175	25	7,8%
150–162	24	8,2%
138–149	23	8,5%
126–137	22	8,9%
115–125	21	9,3%
105–114	20	9,8%
94–104	19	10,3%
85–93	18	10,8%
76–84	17	11,5%
67–75	16	12,2%
59–66	15	13,0%
52–58	14	13,9%
44–51	13	15,1%
38–43	12	16,2%
32–37	11	17,7%
27–31	10	19,2%
22–36	9	21,3%
17–21	8	24,3%
13–16	7	27,7%
10–12	6	31,6%
7–9	5	37,8%
5–6	4	44,7%
3–4	3	57,7%
2	2	70,7%
1	1	100,0%

2.4.8.6 Расчеты концентрации сперматозоидов на основе их подсчета

Сумма чисел, полученных в результате двух принятых повторных подсчетов, делится на коэффициент, который определяется на основе степени разведения и числа больших клеток или квадратов, оцененных в обеих счетных камерах (если после серии из трех повторных подсчетов не было получено достаточно близких результатов, используется среднее значение трех сумм).

Если в каждой камере подсчитано менее 25 сперматозоидов, то при разведении 1+1 (1 : 2) концентрация будет менее 55 555 сперматозоидов/мл (87). Ошибка при расчетах результата составляет более 14% (таблица 2.3) (при более высокой степени разведения концентрация будет выше, но уровень ошибки будет таким же высоким – более 14%). Укажите число наблюдаемых сперматозоидов с комментарием «Подсчитано слишком мало сперматозоидов для точного определения концентрации (менее 56 000/мл)». Если требуется точная оценка небольшого числа сперматозоидов, см. также **раздел 2.4.8.8** ниже.

Таблица 2.4 Расчеты концентрации сперматозоидов на основе их подсчета

	Число больших клеток, оцененных в каждой камере			Число квадратов, оцененных в каждой камере							
				2	3	4	5	6	7	8	9
Разведение	5	10	25	Значения коэффициента коррекции							
	1 : 2	20	40	100	200	300	400	500	600	700	800
1 : 5	8	16	40	80	120	160	200	240	280	320	360
1 : 10	4	8	20	40	60	80	100	120	140	160	180
1 : 20	2	4	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1 : 50	0,8	1,6	4	8	12	16	20	24	28	32	36



Примечание. Гемоцитометр с улучшенной сеткой Нейбауэра имеет две счетные камеры. Каждая счетная камера состоит из девяти (3×3) квадратов одинакового размера. Центральный квадрат состоит из 25 больших клеток, каждая из которых окружена тройной линией, а 8 периферийных квадратов состоят из 16–20 прямоугольников.

2.4.8.7 Расчеты общего числа сперматозоидов

- Крайне важно рассчитать и зафиксировать общее число сперматозоидов в эякуляте, поскольку этот параметр позволяет гораздо лучше оценить выработку спермы яичками и количество сперматозоидов, передаваемых женщине во время полового акта. Для получения этого показателя концентрацию сперматозоидов необходимо умножить на объем всего эякулята.
- Общее число сперматозоидов должно быть представлено в миллионах в виде целого числа (без десятичных знаков), за исключением лишь тех случаев, когда их число не достигает 10 миллионов и для внесения ясности в отношении нижнего диапазона результатов может быть допустим один десятичный знак, хотя использование десятичных знаков оправдано аналитической вариабельностью.

2.4.8.8 Малое число сперматозоидов

Если в повторных влажных препаратах сперматозоиды не наблюдаются, можно предположить полное отсутствие сперматозоидов (азооспермия). Несмотря на то, что предлагалось изменить это определение (88, 89), термин «азооспермия» продолжает использоваться для описания результатов исследования эякулята, но не в качестве диагноза или основания для терапии. Общепринято, что этот термин можно использовать только в том случае, если в осадке центрифугированного образца сперматозоидов не обнаружено (90).

Вместе с тем следует иметь в виду, что:

- обнаружение или необнаружение сперматозоидов в осадке зависит от времени и скорости центрифугирования (91, 92), а также от того, какой объем осадка исследуется;
- центрифугирование при 3000g в течение 15 минут не осаждает все сперматозоиды из образца (93); и
- после центрифугирования может быть потеряна подвижность (46) и будет занижена концентрация (87); если подсчеты проводились на центрифугированном образце, это должно быть четко указано в окончательном отчете.

Если требуется оценка малого числа сперматозоидов, способ обработки образцов зависит от того, достаточно ли получить качественные данные о наличии и подвижности сперматозоидов или необходимо оценить точное число сперматозоидов (см. **Исследование нецентрифугированного эякулята для выявления подвижных сперматозоидов** ниже и **Исследование центрифугированных образцов для выявления сперматозоидов независимо от их подвижности на стр. 47**).

Несмотря на то, что в случае исследования всех девяти квадратов при использовании разведения 1+1 (1 : 2) могут быть получены приблизительные оценки низких концентраций сперматозоидов, ошибка при расчетах будет значительной. Кроме того, исследование эякулята, разведенного в столь незначительной степени, может показать большое количество фонового содержания при микроскопии. Исследование больших камер может занять 10–20 минут, но обнаружение сперматозоидов можно ускорить путем использования флуоресцентного красителя (87). Следует отметить, что в связи с подсчетом столь малых количеств сперматозоидов значения, полученные приведенными ниже методами, следует считать приблизительными, и объемы могут быть неточными.

Исследование нецентрифугированного эякулята для выявления подвижных сперматозоидов

В тех случаях, когда необходимо выявить подвижные сперматозоиды, важно определить, могут ли используемые процедуры центрифугирования повредить сперматозоиды и нарушить их подвижность и, таким образом, привести к получению ложных результатов. При использовании центрифугированных образцов лаборатория должна обеспечить, чтобы применяемые процедуры не оказывали воздействия на подвижность сперматозоидов и их способность к оплодотворению.

Оценка концентрации путем исследования влажных препаратов

1. Используйте два последовательно приготовленных влажных препарата (**раздел 2.4.3.3 на стр. 22**).
2. Последовательно исследуйте все покровное стекло, поле за полем. Начните с одного угла и просматривайте вдоль оси X до противоположной стороны; затем переместитесь на одно поле вдоль оси Y и просматривайте в обратном направлении по всей ширине. Продолжайте перемещаться зигзагообразно, чтобы провести полную и систематическую оценку всей аликвоты (рис. 2.7). Продолжайте осматривать предметное стекло поле за полем.



- При объективе $\times 20$ и окуляре $\times 10$ с апертурой 20 мм поле зрения микроскопа имеет диаметр приблизительно 1000 мкм (**раздел 2.5.9 на стр. 76**). Таким образом, на покровное стекло размером 22 мм \times 22 мм приходится примерно 484 поля для исследования.

3. С учетом числа наблюдаемых в 10 или 20 мкл подвижных и неподвижных сперматозоидов можно рассчитать примерную концентрацию путем умножения общего объема эякулята на число наблюдаемых сперматозоидов и коэффициент:

N = число наблюдаемых сперматозоидов

Vol = объем эякулята (в мл)

Коэффициент (100 на исследуемую аликвоту объемом 10 мкл, 50 – на 20 мкл)

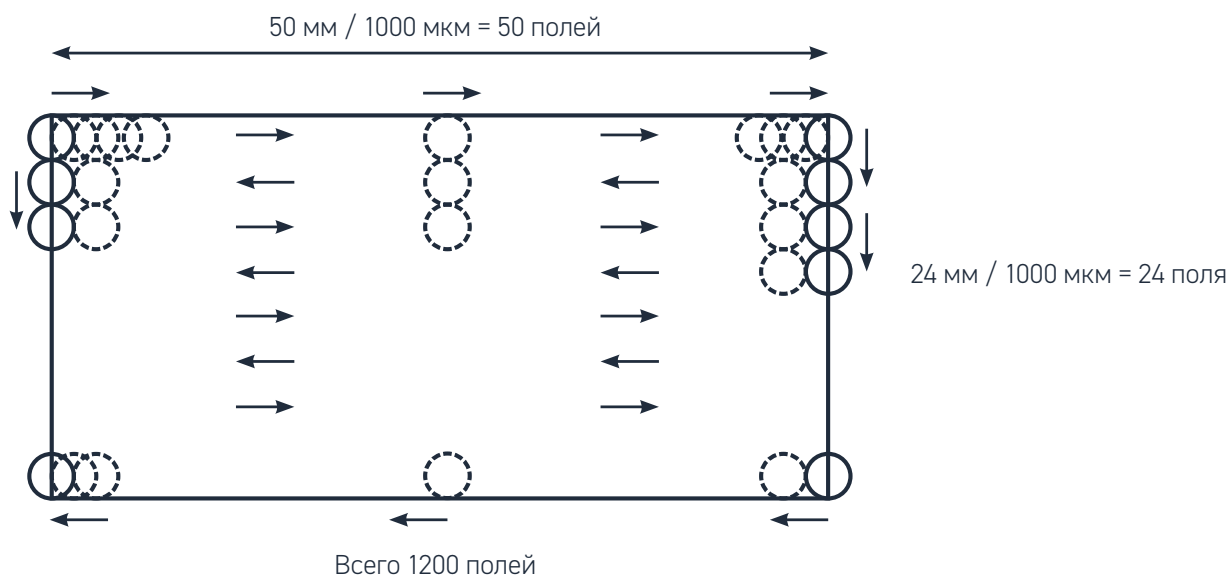
Концентрация (число сперматозоидов/мл) = $N \times Vol \times$ коэффициент.

4. В отчете должно быть указано, что это приблизительное, а не точное значение.

5. Расчет вероятности наличия сперматозоидов, несмотря на результаты исследования влажных препаратов, см. в **разделе 2.5 на стр. 72**.

Рис. 2.7 Исследование всего покровного стекла на предмет наличия подвижных сперматозоидов

Это предполагает оценку полей зрения микроскопа высокого разрешения при увеличении $\times 200$ для покровного стекла размером 22 мм \times 22 мм.



Оценка концентрации на основе наблюдений под большим увеличением

Если в поле зрения при увеличении $\times 400$ наблюдается менее четырех сперматозоидов (т.е. приблизительно менее 1×10^6 /мл), то в отношении мужчин с субфертильностью может быть достаточным зафиксировать в отчете, что предполагаемая концентрация сперматозоидов составляет около 1×10^6 /мл, четко указав, что это лишь весьма приблизительная оценка концентрации сперматозоидов, и отметив, наблюдались ли подвижные сперматозоиды. Такая неточная оценка должна проводиться только в тех случаях, когда целью оценки концентрации сперматозоидов является принятие решения о дальнейшем клиническом обследовании или выбор оптимального типа вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) для пары. Эта оценка не должна использоваться для обычного исследования эякулята, в частности,

для мониторинга потенциального воздействия мужских контрацептивов и реакции на эндокринную стимуляцию сперматогенеза. Если необходимо подсчитать очень низкую концентрацию сперматозоидов или общее число сперматозоидов в эякуляте, осуществляйте подсчет во всех девяти больших квадратах, как описано в **разделе 2.4.8.4 на стр. 37**.

Оценка малого числа сперматозоидов в одноразовых камерах большого объема
Использование камер большого объема с глубиной 100 мкм может повысить чувствительность оценки концентрации (85). Камера большого объема состоит из двух камер глубиной 100 мкм, каждая из которых вмещает 25 мкл. Для предотвращения ошибок выборки необходимо подсчитать критическое число сперматозоидов (предпочтительно в общей сложности не менее 400 путем двойного подсчета примерно по 200) (**таблица 2.16 на стр. 87**).

1. Тщательно перемешайте образец эякулята.
2. Отберите аликвоту эякулята. Если ожидается, что число сперматозоидов будет малым, то подвижные сперматозоиды можно будет легко наблюдать без разведения. При необходимости разведения добавьте фиксатор в отношении 1+1 (1 : 2) (**раздел 2.4.4.4 на стр. 24**).

Разведение 1+1 (1 : 2) для образцов, содержащих при первоначальной оценке менее 2 сперматозоидов (**таблица 2.1 на стр. 23**), подходит для целого диапазона концентраций сперматозоидов и позволяет обнаружить около 200 сперматозоидов во всей камере.

3. В случае использования флуоресцентного микроскопа окрашивание «разведенных» фиксированных сперматозоидов соответствующим красителем, например ДАПИ, может способствовать их выявлению.

Достижение подсчета 200 сперматозоидов на препарат в одноразовой камере большого объема

- Если в исходном влажном препарате в одном поле зрения МВР объемом 4 нл наблюдается только один сперматозоид, то теоретически на один нл приходится 0,25 сперматозоида (250/мкл, или 250 000/мл).
- Камера большого объема вмещает 25 мкл, поэтому в ней будет 6 250 сперматозоидов. Разведение образца 1+1 (1 : 2) снизит фоновое содержание и число сперматозоидов до 3 125 на камеру, что достаточно для приемлемо низкой ошибки выборки.
- Вместе с тем это значение может быть лишь приблизительной оценкой, поскольку подсчитывается столь незначительное число сперматозоидов, и объемы могут быть неточными.

Процедура

1. Возьмите соответствующий образец, как указано выше (разведенный или неразведенный).
2. Заполните каждую камеру предметного стекла жидкостью в объеме 25 мкл.
3. Для предотвращения высыхания оставьте камеру в горизонтальном положении при комнатной температуре во влажном резервуаре (например, на влажной фильтровальной бумаге в закрытой чашке Петри) на 10–15 минут.



(При использовании флуоресценции краситель за это время свяжется с головками сперматозоидов и осевшими на дно камеры неподвижными клетками).

4. Исследуйте предметное стекло при увеличении $\times 250$.
5. Для достижения приемлемо низкой ошибки выборки подсчитайте не менее 200 сперматозоидов в каждом препарате (**таблица 2.16 на стр. 87**).
6. Последовательно исследуйте всю камеру, поле за полем. Начните с одного угла и просматривайте вдоль оси X до противоположной стороны; затем переместитесь на одно поле вдоль оси Y и просматривайте в обратном направлении по всей ширине. Продолжайте перемещаться зигзагообразно. Продолжайте осматривать предметное стекло поле за полем. Продолжайте подсчет минимум до 200 сперматозоидов.
7. Отметьте число полей, которые были оценены в процессе подсчета не менее 200 сперматозоидов. В другой камере оценивается такое же число полей.
8. Подсчитайте число сперматозоидов и полей с помощью лабораторного счетчика.
9. Перейдите ко второй камере и проведите повторный подсчет в том же числе полей (в том же объеме), что и в первом препарате, даже если при этом будет подсчитано менее 200 сперматозоидов.
10. Рассчитайте сумму и разность двух чисел.
11. Определите приемлемость различия по **таблице 2.3 на стр. 39** (максимальное различие между двумя подсчетами, которое, как ожидается, может возникнуть в 95% образцов только из-за ошибки выборки).
12. Если различие приемлемо, рассчитайте концентрацию. Если различие слишком велико, приготовьте два новых препарата и повторите оценку.
13. Отметьте среднюю концентрацию сперматозоидов с точностью до двух значащих цифр.
14. Умножьте концентрацию сперматозоидов на объем эякулята (в мл), чтобы получить общее число сперматозоидов в эякуляте.

Расчет низких концентраций сперматозоидов по результатам исследования полей зрения

Концентрация сперматозоидов в эякуляте рассчитывается как их число (N), разделенное на объем общего числа (n) исследованных полей зрения микроскопа (где объем (v) поля рассчитывается в соответствии с **разделом 2.5.9 на стр. 76**) и умноженное на коэффициент разведения. Таким образом, $C = (N/n) \times (1/v) \times \text{коэффициент разведения}$.

При общем увеличении $\times 250$ объем поля зрения равен 80 нл (**раздел 2.5.9**), и при разведении 1+1 (1 : 2) концентрация составляет:

$C = (N/n) \times (1/80) \times 2 \text{ сперматозоидов/нл} = (N/n) \times (1/40) \text{ сперматозоидов/нл}$ (млн сперматозоидов/мл эякулята).



При общем увеличении $\times 400$ объем поля зрения равен 20 нл (раздел 2.5.9), и при разведении 1+1 (1 : 2) концентрация составляет:

$$C = (N/n) \times (1/20) \times 2 \text{ сперматозоидов/нл} = (N/n) \times (1/10) \text{ сперматозоидов/нл (млн сперматозоидов/мл эякулята)}.$$

При оценке всей площади обеих камер для расчета концентрации сперматозоидов/мкл (тысяч/мл эякулята) общее число сперматозоидов делится на общий объем обеих камер (50 мкл) и умножается на коэффициент разведения (2).

Если образец не был разведен, коэффициент разведения равен 1.

Объем, наблюдаемый в поле зрения микроскопа высокого разрешения в одноразовой камере большого объема глубиной 100 мкм

- Объем эякулята в каждом поле зрения микроскопа зависит от площади поля (πr^2 , где π приблизительно равно 3,142, а r – радиус поля зрения микроскопа) и глубины камеры (здесь 100 мкм).
- Диаметр поля зрения микроскопа может быть измерен с помощью микрометра предметного столика или оценен путем деления диаметра апертуры окуляра на увеличение объектива.
- При объективе $\times 40$ и окуляре $\times 10$ с апертурой 20 мм поле зрения микроскопа имеет диаметр около 500 мкм (20 мм/40). В этом случае $r = 250$ мкм, $r^2 = 62\,500$ мкм², $\pi r^2 = 196\,375$ мкм², а объем составляет 19 637 500 мкм³, или около 20 нл.
- При объективе $\times 25$ и окуляре $\times 10$ с апертурой 25 мм поле зрения микроскопа имеет диаметр около 1000 мкм (25 мм/25). В этом случае $r = 500$ мкм, $r^2 = 250\,000$ мкм², $\pi r^2 = 785\,500$ мкм², а объем составляет 78 550 000 мкм³, или около 80 нл.

Чувствительность метода

Если в каждой камере обнаружено менее 200 сперматозоидов, ошибка выборки превысит 5%. Если в обеих камерах обнаружено менее 400 сперматозоидов, укажите ошибку выборки для числа подсчитанных клеток.

Если в каждой камере подсчитано менее 25 сперматозоидов, концентрация составит менее 2000 сперматозоидов/мл с ошибкой, оцениваемой на уровне более 14%. Укажите число наблюдаемых сперматозоидов с комментарием «Для точного определения концентрации подсчитано слишком мало сперматозоидов (менее 2000/мл)».

Важно отметить, что отсутствие сперматозоидов в исследуемой аликвоте необязательно означает их отсутствие в остальной части образца.

Примеры с решениями

Пример 1

При разведении 1+1 (1 : 2) препарат 1 содержит 210 сперматозоидов в 300 полях зрения, в то время как препарат 2 содержит 300 сперматозоидов в 300 полях зрения. Сумма значений (210+300) в 600 полях зрения равна 510, а разность (300–210) равна 90. Из **таблицы 2.3 на стр. 39** видно, что это, ожидаемое только в силу случайности (44), поэтому результаты отбрасываются и делается два новых повторных разведения.



Пример 2

При разведении 1+1 (1 : 2) препарат 1 содержит 200 сперматозоидов в 400 полях зрения, а препарат 2 – 230 сперматозоидов в 400 полях зрения. Сумма значений (200+230) в 800 полях зрения равна 430, а разность (230-200) равна 30. Из **таблицы 2.3 на стр. 39** видно, что это меньше различия, полученного только в силу случайности (40), поэтому значения принимаются.

Концентрация сперматозоидов в образце при разведении 1+1 (1 : 2) будет следующей: $C = (N/n) \times (2/v)$ сперматозоидов/нл. Если $v = 20$ нл (увеличение $\times 400$), то $C = (430/800) \times (2/20) = 0,0538$ сперматозоидов/нл, или 54 000 сперматозоидов на мл эякулята (с точностью до двух значащих цифр).

Пример 3

При разведении 1+1 (1 : 2) препарат 1 содержит 50 сперматозоидов во всей камере, а препарат 2 – 70 сперматозоидов. Сумма значений (50+70) в двух камерах равна 120, а разность (70-50) равна 20. Из таблицы 2.3 следует, что это меньше различия, полученного только в силу случайности (21), поэтому значения принимаются.

При оценке всей площади обеих камер (всего 50 мкл) концентрация сперматозоидов в образце при разведении 1+1 (1 : 2) составляет: $C = (N/50) \times 2$ сперматозоидов на мкл = $(120/50) \times 2 = 4,8$ сперматозоида/мкл, или 4 800 сперматозоидов/мл эякулята (с точностью до двух значащих цифр). Поскольку было подсчитано менее 400 сперматозоидов, укажите ошибку выборки для 120 сперматозоидов, приведенную в **таблице 2.3 на стр. 39** (9,3%).

Пример 4

При разведении 1+1 (1 : 2) препарат 1 содержит 20 сперматозоидов во всей камере, а препарат 2 – 18 сперматозоидов во всей камере. Поскольку в каждой камере обнаружено менее 25 сперматозоидов, концентрация будет составлять менее 2000 сперматозоидов/мл. Укажите, что «в образцах было обнаружено 38 сперматозоидов, что слишком мало для точного определения концентрации (менее 2000/мл)».

Пример 5

При разведении 1+1 (1 : 2) ни в одном из препаратов сперматозоидов не обнаружено. Поскольку в каждой камере обнаружено менее 25 сперматозоидов, концентрация будет менее 2000 сперматозоидов/мл. Укажите, что «в препаратах сперматозоидов не обнаружено. Слишком мало клеток для точного определения концентрации (менее 2000/мл)».

Расчет общего числа сперматозоидов

Рекомендуется рассчитывать и указывать общее число сперматозоидов в эякуляте, поскольку этот параметр позволяет оценить выработку сперматозоидов яйцками и количество сперматозоидов, передаваемых женщине во время коитуса. Этот показатель получается путем умножения концентрации сперматозоидов на объем всего эякулята.

Исследование центрифугированных образцов для обнаружения сперматозоидов независимо от их подвижности

Если ни в одном из влажных препаратов сперматозоиды не наблюдаются, а статус подвижности сперматозоидов не имеет значения, образец можно центрифугировать для определения наличия сперматозоидов в более крупном объеме образца.

1. Тщательно перемешайте образец эякулята.
 2. Отберите аликвоту эякулята объемом 1 мл и центрифугируйте ее предпочтительно при скорости 3000g в течение 15 минут.
 3. Слейте большую часть супернатанта и ресуспендируйте осадок со сперматозоидами в оставшейся семенной плазме объемом примерно 50 мкл.
 4. Приготовьте один или два влажных препарата объемом 10 мкл (**раздел 2.4.3 на стр. 21**) и выполните оценку, как описано ранее (**раздел 2.4.4 на стр. 22**).
- Наличие сперматозоидов в образце указывает на:
 - наличие прохода из яичка (яичек) в уретру;
 - крайне ограниченную выработку сперматозоидов или их затрудненное перемещение.
 - Отсутствие сперматозоидов позволяет предположить:
 - возможно полное отсутствие сперматозоидов (азооспермия), которое, по всей вероятности, вызвано:
 - отсутствием или крайне низким уровнем выработки сперматозоидов;
 - отсутствием прохода из яичка (яичек) в уретру.

2.4.9 Морфология сперматозоидов

Морфологическая оценка сперматозоидов человека важна не только для прогнозирования в ограниченных пределах спонтанного наступления беременности или результатов применения ВРТ, но и в большей степени для получения диагностической информации о функциональном состоянии мужских репродуктивных органов, в первую очередь яичек и придатка яичка. Для оценки состояния мужских репродуктивных органов недостаточно только определить долю «нормальных» сперматозоидов. Важно оценить специфическую морфологию головки, шейки/средней части и хвоста, а также возможное наличие аномальных остатков цитоплазмы.

Все образцы эякулята человека содержат сперматозоиды с широким спектром различных морфологических признаков. Используемые ранее определения морфологии сперматозоидов были основаны главным образом на опыте ветеринарной медицины и исследованиях под микроскопом.

Представленные здесь критерии были разработаны на основе изучения морфологии сперматозоидов, способных проникать через цервикальную слизь и связываться с блестящей оболочкой.

Термин «нормальный» сперматозоид в некотором смысле неоднозначен, что вызывает недопонимание и даже научные конфликты. Одно из общих значений термина «нормальный» заключается в качестве, характерном, например, для той или иной популяции. Это не относится к «нормальной морфологии сперматозоидов» человека. Другое значение этого термина заключается в том, что клетка или индивидуум не затронуты болезнью, но нормальная морфология не означает, что сперматозоид не может быть носителем какой-либо другой причины патологии (например, неподвижный хвост или поврежденная ДНК).

Вариабельность морфологии сперматозоидов человека затрудняет их оценку, но изучение сперматозоидов, извлеченных из женских половых путей, особенно из посткоитальной эндоцервикальной слизи (94, 95), а также с поверхности блестящей оболочки (96, 97) (рис. 2.8 на стр. 50), способствовало определению внешнего вида сперматозоидов, потенциально обладающих оплодотворяющей способностью (морфологически нормальных или, лучше сказать, «идеальных» или «типичных» сперматозоидов). При строгом применении определенных критериев морфологии сперматозоидов были установлены взаимосвязи между процентной долей «нормальных» форм и различными параметрами фертильности (время до наступления беременности, частота наступления беременности *in vivo* и *in vitro*) (58, 96, 98–103), что может быть важно для прогнозирования фертильности.

Философия описанной здесь системы классификации основана на определении того, что является типичным для субпопуляции преобладающих в эндоцервикальной слизи сперматозоидов, потенциально обладающих оплодотворяющей способностью. Диапазон процентных значений нормальных форм как для фертильных, так и для бесплодных мужчин, по всей вероятности, будет значительно ниже 30% (104). Это неизбежно приведет к низким пороговым значениям, позволяющим проводить различие между фертильной и бесплодной популяциями; действительно, в рамках исследований экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) (99), внутриматочной инсеминации (ВМИ) (101) и фертильности *in vivo* (105) были получены референсные пределы и пороговые значения для нормальных форм на уровне 3–5%. Кроме того, следует подчеркнуть, что наблюдаемые различия в групповых средних значениях между бесплодными и субфертильными мужчинами не означают автоматически, что рассчитанные «пределы» могут быть использованы для интерпретации результатов исследования эякулята конкретных мужчин. Чтобы такие пределы можно было использовать, необходимо определить прогностическую ценность положительных и отрицательных результатов. Это сложно, например, когда речь идет о доле «нормальных» (или «идеальных» или «типичных») сперматозоидов. Чтобы статистически различить, например, 3% и 5% «нормальных» форм у конкретных мужчин, необходимо, чтобы высококвалифицированный персонал оценил 1500 сперматозоидов.

Среди сперматозоидов, связанных с блестящей оболочкой ооцита человека, также наблюдается субпопуляция морфологически схожих сперматозоидов (103).

Для лучшего понимания морфологии сперматозоидов человека на уровне исследования под световым микроскопом может быть полезен всесторонний обзор ультраструктуры и функции сперматозоидов (106).

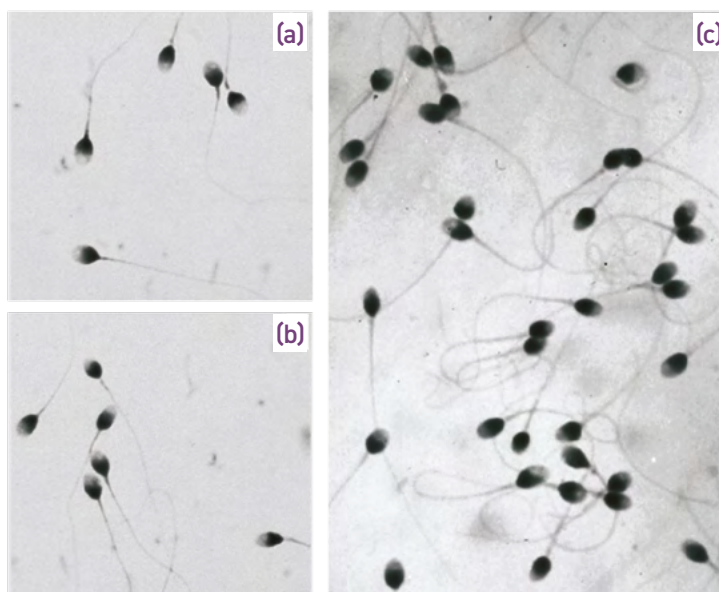
Практическая морфологическая оценка сперматозоидов человека включает следующие этапы:

- приготовление мазка эякулята на предметном стекле (раздел 2.4.9.1 на стр. 50);
- высушивание на воздухе, фиксацию и окрашивание предметного стекла (раздел 2.4.9.2 на стр. 54);
- заключение предметного стекла с покровным стеклом в гистологическую среду в случае длительного хранения предметного стекла (раздел 2.4.9.5 на стр. 56);

- исследование предметного стекла под световым микроскопом при увеличении $\times 1000$ с использованием масляной иммерсии (**раздел 2.4.9.6 на стр. 57**); и
- оценку примерно 200 сперматозоидов (**раздел 2.4.9.6**).
- Об устранении проблем при морфологической оценке см. **раздел 7.10.2 на стр. 239**.

Рис. 2.8 Морфология «идеальных» сперматозоидов

(a, b) Окрашенные по Шорру сперматозоиды, полученные из зоны пеллюцида *in vitro*. (c) Окрашенные по Папаниколау сперматозоиды, полученные из эндоцервикальной слизи после полового акта. Наблюдается очень мало дефектов на головке, средней части или основной части сперматозоидов. Хвосты могут быть изогнуты, но не под большим углом. (a, b)



Перепечатано из документа Лиу и др. (2003 г.) с разрешения Европейского общества репродукции человека и эмбриологии. (c) Перепечатано с разрешения Менквелда и Крюгера (1990 г.).

2.4.9.1 Приготовление мазков эякулята

Быстрое добавление фиксатора в эякулят не позволяет надлежащим образом визуализировать сперматозоиды, поскольку они затемняются денатурированными белками семенной жидкости. Для морфологического анализа обычно готовят мазки эякулята, которые высушивают на воздухе перед фиксацией и окрашиванием. Однако такой процесс приводит к появлению морфологических артефактов, поскольку высушивание мазков семенной жидкости на воздухе связано с:

- изменениями размеров сперматозоидов: высушенные, фиксированные и окрашенные сперматозоиды меньше, чем живые сперматозоиды, визуализированные в семенной жидкости (107);
- расширением головок незрелых сперматозоидов (Солер и др., 2000); и

- потерей осмотически чувствительных капель цитоплазмы (108, 109), несмотря на сохранение большого количества избыточной остаточной цитоплазмы.

Из свежего образца эякулята следует сделать два или более мазков на случай, если возникнут проблемы с окрашиванием или одно предметное стекло будет сломано.

1. Тщательно перемешайте образец эякулята.
2. Незамедлительно отберите аликвоту, не позволяя сперматозоидам осесть в суспензии.
3. Перемешайте образец эякулята перед отбором повторных аликвот (второй мазок используется в качестве резервного в случае проблем с окрашиванием).

Образцы эякулята с нормальными характеристиками

При выполнении этой процедуры аликвота эякулята размазывается по всей поверхности предметного стекла с помощью второго стекла (рис. 2.9).

1. Очистите обе поверхности матовых полос предметных стекол, энергично протерев их безворсовой салфеткой или используя этанол.
2. Нанесите на матовую полосу идентифицирующую информацию, содержащую два уникальных идентификатора; убедитесь в том, что маркировка не станет нечитаемой в результате фиксации, окрашивания или заключения в гистологическую среду.
3. Нанесите аликвоту эякулята объемом 5–10 мкл, в зависимости от концентрации сперматозоидов, на край предметного стекла. С помощью второго предметного стекла протяните каплю эякулята по поверхности предметного стекла (рис. 2.9). Если размазывающее предметное стекло не имеет матовой полосы, кромки обоих краев предметного стекла можно использовать для получения четырех разных мазков.
4. Высушите предметные стекла на воздухе и окрасьте их, как описано в **разделе 2.4.9.2 на стр. 54**.

Качество мазка (минимальное перекрытие сперматозоидов на предметном стекле) зависит от:

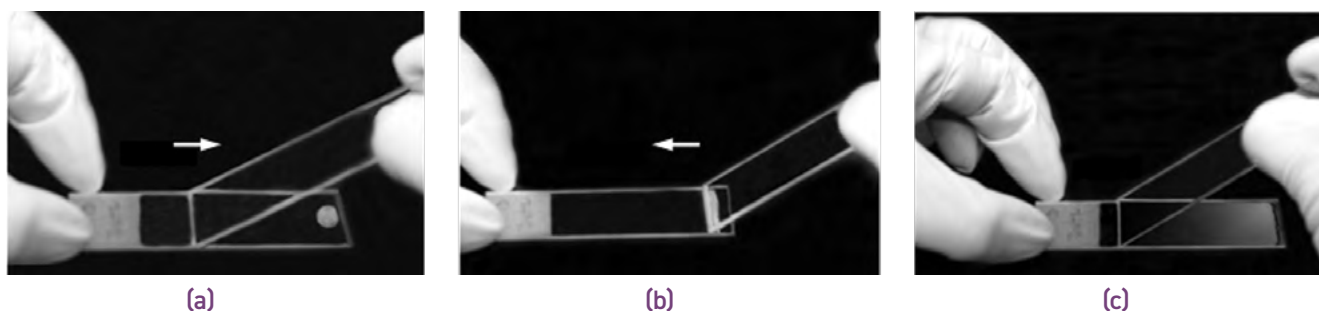
- объема эякулята и концентрации сперматозоидов: чем меньше сперматозоидов, тем меньше вероятность того, что они перекроют друг друга;
- угла наклона размазывающего предметного стекла: чем меньше угол, тем тоньше мазок; и
- скорости размазывания: чем быстрее движение, тем тоньше мазок.

Начните с объема 10 мкл, угла 45° и скорости выполнения мазка около 1 секунды. Затем, при необходимости, эти параметры можно изменять, с тем чтобы уменьшить перекрытие сперматозоидов на предметном стекле (95). Этот метод эффективен при низкой вязкости спермы, но часто бывает непригоден в случае крайне вязкой спермы (рис. 2.9).



Рис. 2.9 Приготовление обычного мазка эякулята

Чтобы чувствовать движение, установите размазывающее предметное стекло под углом 45° и двигайте его до контакта с аликвотой эякулята (a), которая растечется вдоль края предметного стекла (b). Для получения мазка медленно двигайте размазывающее предметное стекло в обратном направлении (примерно 1 секунду) по всей длине предметного стекла (c).



Фотографии любезно предоставил К. Брэзил.

Образцы эякулята с аномальными характеристиками

Для образцов с низкой концентрацией сперматозоидов (менее $2 \times 10^6/\text{мл}$), повышенной вязкостью или большим количеством дебриса могут потребоваться другие подходы.

Образцы эякулята с низкой концентрацией сперматозоидов

При низкой концентрации сперматозоидов (например, менее $2 \times 10^6/\text{мл}$) повысьте концентрацию образца следующим образом:

1. Центрифугируйте образец при $600g$ в течение 10 минут.
2. Удалите большую часть супернатанта.
3. Ресуспендируйте осадок в оставшемся супернатанте осторожным пипетированием.
4. Получите максимально возможную концентрацию сперматозоидов, не превышающую примерно $50 \times 10^6/\text{мл}$.
5. Обработайте как образец с нормальными характеристиками (**раздел 2.4.9.2 на стр. 54**).



Примечание. Эта процедура может оказать воздействие на морфологию сперматозоидов, и ее применение должно быть зафиксировано в заключительном отчете.

Образцы эякулята с повышенной вязкостью

Иногда бывает трудно приготовить хорошие мазки, поскольку семенная плазма обладает высокой вязкостью, в результате чего мазки получаются неравномерной толщины. Образцы с повышенной вязкостью можно обрабатывать так же, как и плохо разжиженные образцы (**раздел 2.5.2 на стр. 72**), или путем отмыwania.



Примечание. Эти процедуры могут оказать воздействие на морфологию сперматозоидов, и их применение должно быть зафиксировано в заключительном отчете.

Образцы эякулята с большим количеством дебриса или с повышенной вязкостью Дебрис и большое количество твердых частиц (например, в образцах с повышенной вязкостью) могут привести к тому, что головки сперматозоидов будут лежать на краю, что затруднит классификацию сперматозоидов. Такие образцы могут быть отмыты следующим образом:

1. Разведите аликвоту тщательно перемешанного эякулята (0,2–0,5 мл в зависимости от концентрации сперматозоидов) в 170 ммолях солевого раствора, чтобы уменьшить осмотические изменения сперматозоидов. В зависимости от времени, прошедшего после эякуляции до приготовления препарата, осмоляльность эякулята может увеличиться до 350–400 мОсм/кг. Среда, изотоничная по отношению к общей осмоляльности тела (290 мОсм/кг), вызовет гипоосмотический шок у сперматозоидов, адаптированных к более высокой осмоляльности в разжиженном эякуляте (17, 18).
2. Центрифугируйте при 800g в течение 10 минут.
3. Слейте большую часть супернатанта.
4. Ресуспендируйте осадок в оставшемся супернатанте (обычно 20–40 мкл) осторожным пипетированием.
5. Сделайте мазок суспензии, распределив 5–10 мкл суспензии сперматозоидов на предметном стекле микроскопа с помощью пипетки Пастера (рис. 2.9b).
6. Осмотрите предметное стекло под фазово-контрастным микроскопом при увеличении $\times 400$, с тем чтобы убедиться в равномерном распределении мазка.
7. Убедитесь, что на одно поле зрения $\times 400$ приходится не менее 40 сперматозоидов без скопления или перекрытия.
8. Высушите предметные стекла на воздухе и окрасьте их, как описано в разделе 2.4.9.2.
 - Если слишком многие сперматозоиды перекрывают друг друга на предметном стекле, сделайте еще один мазок, используя аликвоту эякулята меньшего объема.
 - Если на предметном стекле слишком мало сперматозоидов, сделайте еще один мазок, используя аликвоту эякулята большего объема.
 - Эти процедуры могут оказать воздействие на морфологию сперматозоидов, и их применение должно быть зафиксировано.

2.4.9.2 Фиксация и окрашивание

После того как мазки эякулята высохнут на воздухе, их следует зафиксировать и окрасить, чтобы выделить особенности сперматозоидов. Рекомендуется использовать окрашивание по Папаниколау, поскольку тщательные проверки и оценки на соответствие строгим тигербергским критериям проведены с использованием этого типа окрашивания, который обеспечивает наилучшую общую видимость всех областей сперматозоида человека (95, 110-113). Использование другого окрашивания должно быть валидировано в сравнении с описанным окрашиванием по Папаниколау, адаптированным для сперматозоидов человека.

При рекомендуемом методе окрашивания под световым микроскопом (освещение по Келлеру) головка окрашивается в бледно-голубой цвет в акросомной области и в темно-синий цвет в постакросомной области. Окрашиваются акросомная и постакросомная области головки, избыточная остаточная цитоплазма, средняя часть и основная часть. В средней части может наблюдаться некоторое красное окрашивание, а хвост окрашивается в синий или красноватый цвет. Избыточная остаточная цитоплазма, обычно расположенная за головкой и вокруг средней части, обычно окрашивается в зеленый цвет; если она окрашивается в красноватый цвет, это может указывать на другие аномалии.

Методика Папаниколау обеспечивает также хорошее окрашивание других клеток. Описанная здесь методика окрашивания иногда помогает отличить незрелые половые клетки от клеток, не относящихся к сперматозоидам (рис. 2.15 на стр. 70 и рис. 2.16 на стр. 71). Обычные процедуры были модифицированы для работы без эфира (в качестве фиксатора) или ксилола (для гистологической среды) (114) (раздел 2.4.9.3). Предметные стекла, окрашенные по методике Папаниколау, можно заключать в гистологическую среду и хранить для дальнейшего использования в рамках программ обучения и внутреннего контроля качества. При хранении в темноте они остаются стабильными в течение нескольких месяцев или лет.

Существуют и некоторые другие распространенные методики, описанные в последней части этой главы: окрашивание по Шорру и быстрое окрашивание. Причина, по которой мы рекомендуем окрашивание по Папаниколау, заключается в том, что оно по-прежнему является наилучшей оцененной методикой. Для глобального использования необходимо, чтобы методики и критерии оценки были стандартизированы. Другие методики могут быть использованы, но при условии надлежащей оценки и валидации с помощью стандартных методов, особенно если они используются для научных исследований.

2.4.9.3 Этапы фиксации и окрашивания по Папаниколау¹

Эта процедура включает нижеперечисленные этапы:

Таблица 2.5 Этапы фиксации и окрашивания по Папаниколау

ФИКСАЦИЯ				
Этанол	95% (v/v)	Не менее 15 минут	фиксация клеток, а также их дегидратация	
ОКРАШИВАНИЕ				
1	Разбавленный этанол	80% (v/v) ²	30 секунд	постепенная регидратация фиксированных мазков для обеспечения окрашивания водным раствором гематоксилина
2	Разбавленный этанол	50% (v/v)	30 секунд	
3	Очищенная вода		30 секунд	регидратация высушенных мазков для обеспечения окрашивания водным раствором
4	<u>Гематоксилин Харриса</u>		4 минуты	окрашивание ядер в синий цвет
5	Очищенная вода		30 секунд	удаление не связанного с ядрами гематоксилина
6	Кислый этанол ³		4–8 погружений ^{4,5}	удаление неспецифически связанного красителя из цитоплазмы (обесцвечивание)
7	Очищенная вода		30 секунд	снижение кислотности и возвращение синей окраски ядер; при недостатке водопроводной воды можно использовать раствор Скотта
8	Проточная холодная водопроводная вода		5 минут	
9	Этанол	50% (v/v)	30 секунд	дегидратация мазков для окрашивания растворимым в этаноле красителем
10	Этанол	80% (v/v)	30 секунд	Оранжевый G/EA-50
11	Этанол	95% (v/v)	не менее 15 минут	
12	Краситель G-6 оранжевый		1 минута	окрашивание цитоплазмы в розовый цвет
13	Этанол	95% (v/v)	30 секунд	
14	Этанол	95% (v/v)	30 секунд	
15	Этанол	95% (v/v)	30 секунд	
16	Краситель EA-50 зеленый		1 минута	окрашивание цитоплазмы и ядер в розовый цвет
17	Этанол	95% (v/v)	30 секунд	
18	Этанол	95% (v/v)	30 секунд	
19	Этанол	100%	15 секунд	постепенная дегидратация окрашенных мазков в целях использования растворимой в этаноле гистологической среды
20	Этанол	100%	15 секунд	в целях использования не растворимой в этаноле гистологической среды
21	Ксилол			

¹ Компоненты красителей по Папаниколау: коммерчески доступны или см. **раздел 8.4.11 на стр. 267**.

² Фиксация этанолом вызывает дегидратацию клеток. Поэтому для мазков, взятых для окрашивания непосредственно после фиксации в 95%-ном этаноле, может потребоваться всего 10 секунд в 80%-ном этаноле, тогда как мазки, высушенные после фиксации на воздухе, должны оставаться в 50%-ном этаноле более длительное время (2–3 минуты).

³ Кислый этанол: добавьте 1,0 мл концентрированной соляной кислоты к 200 мл 70%-ного (v/v) этанола.

⁴ Длительность одного погружения составляет примерно 1 секунду.

⁵ Начните с четырех погружений; продолжайте до тех пор, пока результаты не будут удовлетворительными. Это критически важный этап, поскольку продолжительность окрашивания резко изменяет интенсивность конечной окраски. Если этот шаг пропустить, сперматозоиды и фон будут темными. Увеличение числа погружений сделает сперматозоиды и фон более бледными.

Предметные стекла можно просматривать заключенными или не заключенными в гистологическую среду (без покровных стекол или с ними). Заключение предметных стекол в гистологическую среду позволяет хранить их в течение длительного времени, с тем чтобы, при необходимости, их можно было повторно исследовать и использовать в рамках программы внутреннего контроля качества (ВКК). Показатель преломления (ПП) среды после высушивания (1,498–1,55) аналогичен показателю преломления стекла (1,50–1,58), а наилучшее оптическое качество достигается при использовании иммерсионного масла, которое имеет аналогичный ПП (1,515).

2.4.9.4 Обработка окрашенного мазка эякулята перед заключением в гистологическую среду

Существует два вида жидкости для заключения препаратов: гистологические среды, растворимые и не растворимые в этаноле.

- Используйте гистологическую среду, растворимую в этаноле, непосредственно на мазках, еще влажных от этанола.
- При использовании гистологической среды, не растворимой в этаноле, возьмите предметные стекла сразу же после вышеуказанного этапа 19 и выполните следующие шаги (работайте в вытяжном шкафу):
 - заменитель ксилола⁶ этанол, 1+1 (1 : 2) 1 минута
 - 100%-ный заменитель ксилола 1 минута
 - Извлекайте предметные стекла по одному из емкости для окрашивания заменителем ксилола и дайте ему стечь только в течение 1–2 секунд, поскольку при заключении в гистологическую среду предметные стекла должны быть достаточно влажными от ксилола.

2.4.9.5 Заключение окрашенных мазков эякулята в гистологическую среду

При заключении окрашенных мазков в гистологическую среду риск загрязнения объективов микроскопа отсутствует.

1. Поместите покровное стекло (24 мм × 50 мм или 24 мм × 60 мм) на сложенное в несколько раз бумажное полотенце.
2. Распределите гистологическую среду в гантелеобразной форме на покровном стекле.
3. Затем положите предметное стекло мазком вниз на покровное стекло.
4. Надавите на предметное стекло, с тем чтобы распределить гистологическую среду.
5. Оставьте заключенный в среду мазок для высыхания в горизонтальном положении с покровным стеклом сверху в штативе для сушки предметных стекол или на абсорбирующей бумаге в вытяжном шкафу до следующего дня.

⁶ Ксилол представляет опасность для здоровья и не должен использоваться. В настоящее время существуют заменители, такие как NeoClear.



2.4.9.6 Исследование окрашенного препарата

Морфологическая классификация сперматозоидов

Для получения практически применимой морфологической оценки сперматозоидов необходимо, чтобы ее проводили специально подготовленные сотрудники лаборатории, регулярно осуществляющие ВКК. Для проведения межлабораторных сравнений и внедрения методик и предельных значений для принятия решений, разработанных в других центрах, необходимо также принимать участие в надлежащих внешних оценках качества (ВнОК). Рекомендуемая здесь классификация сперматозоидов, как идеальных («типичных сперматозоидов, способных достичь место оплодотворения»), так и аномальных, основана на признании аномалий во всех областях сперматозоида. Для проведения надлежащей морфологической оценки специалист должен быть ознакомлен со всеми критериями, то есть, даже если лаборатория предпочитает указывать только долю идеальных или аномальных сперматозоидов, ВКК и ВОК должны оценивать способность правильно распознавать аномалии во всех областях. При оценке морфологической нормальности сперматозоидов следует применять нижеперечисленные критерии (95, 99, 115).

Сперматозоид состоит из головки и хвоста. Часть хвоста, которая соединена с головкой, и более толстая часть, содержащая митохондрии, называется средней частью. Остальная часть хвоста состоит из основной части (аксонема, или ресничная структура, окруженная внешними плотными волокнами), фиброзной оболочки с продольными столбиками (116) и концевой части. Поскольку концевую часть трудно увидеть с помощью светового микроскопа, можно считать, что клетка состоит из головки (и шейки) и хвоста (средней части и основной части). Чтобы считать сперматозоид нормальным, его головка, средняя часть, хвост и цитоплазматический остаток должны считаться нормальными. Все пограничные формы следует считать аномальными.

В целом, форма головки представляется более важной, чем ее точный размер (раздел 2.5.16 на стр. 89). Следует отметить, что аномально большие головки не являются нормальными: существуют диплоидные сперматозоиды с плоской боковой поверхностью головки, в ~1,6 раза превышающей размер головки идеального сперматозоида. Для оценки нормальной морфологии сперматозоидов необходимо научиться распознавать тонкие различия в форме всего сперматозоида (нормальные/пограничные головки и хвосты сперматозоидов; рис. 2.13, 2.14 и 2.15).

Дефектный сперматогенез и некоторые патологии придатка яичка обычно связаны с повышенной процентной долей сперматозоидов с аномальной формой. Морфологические дефекты, как правило, носят смешанный характер. Аномальные сперматозоиды обычно имеют более низкую способность к оплодотворению, в зависимости от типа аномалий, а также могут иметь аномальную ДНК. Морфологические дефекты связаны с повышенной фрагментацией ДНК (117), повышенной частотой структурных хромосомных aberrаций (118), незрелым хроматином (119) и анеуплоидией (120, 121). Поэтому особое внимание уделяется форме головки, хотя хвост сперматозоида (средняя и основная части) также важно учитывать для понимания состояния мужских половых путей.

Цитоплазматические остатки (122) являются нормальными компонентами физиологически функциональных сперматозоидов человека.

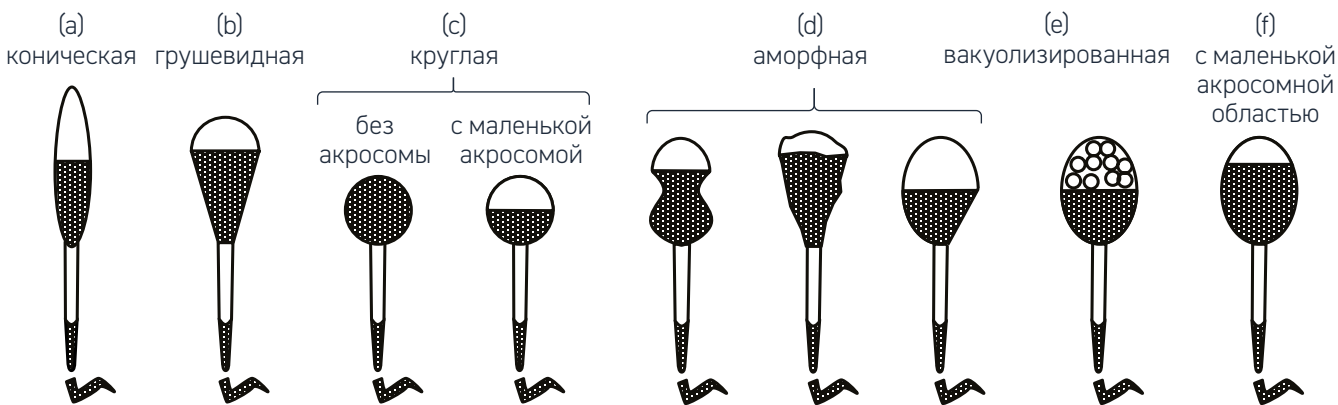


Цитоплазматические остатки осмотически чувствительны и плохо сохраняются при обычной процедуре высушивания на воздухе (109, 123). Они не очевидны на окрашенных препаратах, где они могут выглядеть как небольшие расширения средней части. Набухшие цитоплазматические остатки могут распространяться по всей длине средней части, что можно наблюдать при исследовании живых клеток в семенной жидкости, цервикальной слизи и гистологической среде под фазово-контрастным, дифференциальным интерференционно-контрастным и рентгеновским микроскопом (108, 124). Избыточная остаточная цитоплазма связана с аномальными сперматозоидами, вырабатываемыми в результате дефектного процесса сперматогенеза. Такую аномальную избыточную цитоплазму не следует путать с более физиологичными цитоплазматическими остатками, которые можно наблюдать при прямой микроскопии эякулята, но не в высушенных, фиксированных и окрашенных морфологических мазках (16).

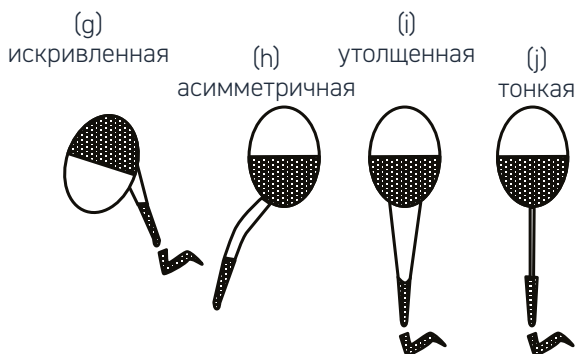
Закрученные хвосты (более 360°, рис. 2.10) могут указывать на дисфункцию придатка яичка (125).

Рис. 2.10 Схематическое изображение некоторых аномальных форм сперматозоидов человека

А. Дефекты головки



В. Дефекты шейки и средней части



С. Дефекты хвоста



Д. Избыточная остаточная цитоплазма



Таблица 2.6 Морфологическая классификация сперматозоидов

Область	Нормальный (идеальный/типичный) вид	Аномальный вид
Головка	Головка должна быть гладкой, с четкими контурами и в целом овальной формы. Акросомная область должна быть хорошо выражена и составлять 40–70% области головки (%Г). В акросомной области не должно быть больших вакуолей и более двух маленьких вакуолей, которые не должны занимать более одной пятой части головки сперматозоида. Постакросомная область не должна содержать вакуолей.	<ul style="list-style-type: none"> • акросома составляет менее 40% или более 70% нормальной области головки, или • отношение длины к ширине менее 1,5 (круглая) или более 2 (вытянутая), или • форма: грушевидная, аморфная, асимметричная или не овальная в апикальной части, или • вакуоли составляют более одной пятой части области головки или расположены в постакросомной области, или • двойные головки, или • любые сочетания
Средняя часть	Средняя часть должна быть тонкой, правильной формы и примерно такой же длины, как головка сперматозоида. Главная ось средней части должна совпадать с главной осью головки сперматозоида.	<ul style="list-style-type: none"> • неправильная форма, или • слишком тонкая или толстая, или • входит в головку асимметрично или под углом, или • резко изогнутая, или • любые сочетания
Хвост	Основная часть должна быть равномерного диаметра по всей длине, тоньше средней части и составлять в длину около 45 мкм (примерно в 10 раз больше длины головки). Он может закручиваться сам на себя при условии, что нет резкого перегиба, указывающего на сломанный жгутик.	<ul style="list-style-type: none"> • с остроугольными изгибами, или • шпилькообразный, или • закрученный, или • короткий (сломанный), или • неравномерной ширины, или • несколько хвостов, или • любые сочетания
Цитоплазматический остаток	Цитоплазматические капли (менее одной трети от нормального размера головки сперматозоида) являются нормой.	<ul style="list-style-type: none"> • остаточная цитоплазма считается аномалией только тогда, когда она превышает одну треть от нормального размера головки сперматозоида

Категории аномалий сперматозоидов

Интерес представляют следующие категории, или области:

- головка (%Г)
- шейка и средняя часть (%ШС)
- хвост (%Х)
- избыточная остаточная цитоплазма (%Ц).



Можно использовать счетчик с несколькими клавишами: одна клавиша для нормальных (идеальных, типичных) сперматозоидов, одна для аномальных и по одной для каждой из четырех категорий аномалий (Г, ШС, Х, Ц). Для ввода нескольких аномалий можно использовать механический счетчик, удерживая нажатой первую клавишу при вводе других аномалий, наблюдаемых на конкретном сперматозоиде. Таким образом, каждый сперматозоид учитывается только один раз, и каждая из его аномалий оценивается отдельно.

- По результатам оценки 200 сперматозоидов можно получить процентную долю идеальных и аномальных сперматозоидов (в сумме эти два показателя должны составлять 100%), а также процентную долю каждого типа аномалий, т.е. %Г, %ШС, %Х и %Ц (сумма этих последних показателей должна превышать 100%, если оценка проведена правильно).
- Процентную долю сперматозоидов в этих категориях аномалий получают путем деления общего числа сперматозоидов с дефектом в данной категории на общее число оцененных сперматозоидов. Эти показатели используются для расчета индекса тератозооспермии (ИТЗ) (**раздел 3.2 на стр. 97**).

Описания других конкретных дефектов сперматозоидов и других типов клеток. Иногда многие сперматозоиды имеют специфические структурные дефекты. Например, акросома может не развиваться, что приводит к «дефекту круглой головки», или «глобозооспермии». Если во время выработки спермы базальная пластинка не прикрепляется к ядру на противоположном от акросомы полюсе, головки поглощаются, и в семенной жидкости обнаруживаются только хвосты (так называемый «дефект булавочной головки»). Булавочные головки (свободные хвосты) не подсчитываются как дефекты головки, поскольку они не имеют хроматина, или структуры головки, расположенной перед базальной пластинкой. Пациенты, у которых все сперматозоиды имеют один из этих дефектов, обычно стерильны. Такие случаи встречаются редко, но выявлять и правильно регистрировать их крайне важно. Если имеется много булавочных головок или свободных головок, может быть определена их распространенность по отношению к сперматозоидам (**разделы 2.5.16 и 2.5.17**).

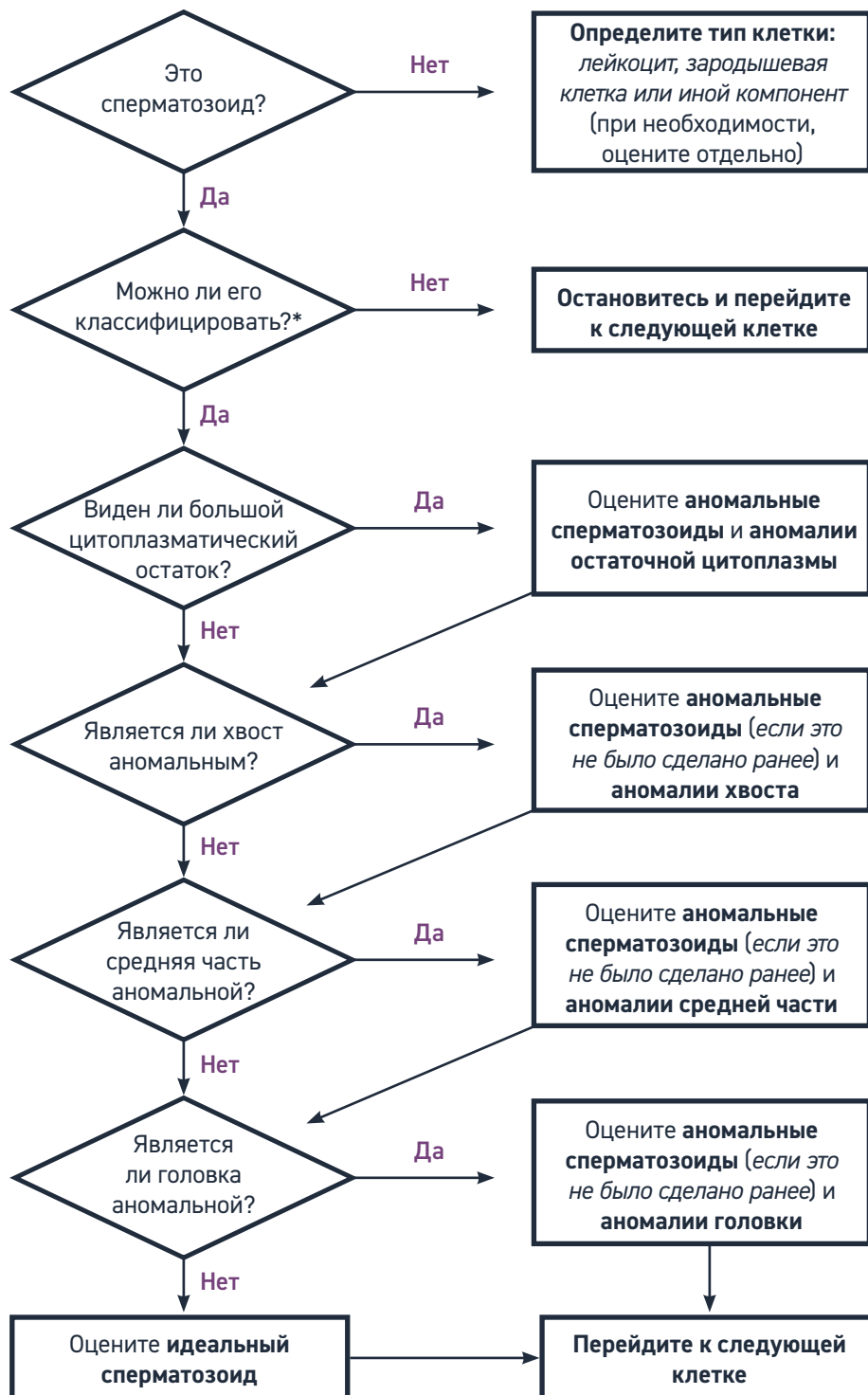
Зафиксируйте наличие и распространенность по отношению к сперматозоидам:

- специфических дефектов сперматозоидов, например, свободных головок сперматозоидов, булавочных головок (свободных хвостов), головок без акросом;
- незрелых половых клеток (рис. 2.15 и 2.16); и
- клеток, не относящихся к сперматозоидам (рис. 2.15 и 2.16).

Если таких дефектов или клеток, не относящихся к сперматозоидам, много, может быть определена их распространенность по отношению к сперматозоидам.

Структурированный порядок морфологической оценки сперматозоидов человека. Дидактическая последовательная оценка каждого сперматозоида полезна как при обучении, так и при проведении обычного исследования (126).

Рис. 2.11 Структурированный порядок морфологической оценки сперматозоидов человека



* С головкой и хвостом, четко видимыми и не перекрытыми другими клетками или компонентами

Микроскопическая оценка и расчет результатов

При рекомендуемой здесь парадигме морфологической оценки следует учитывать все функциональные области сперматозоида. Нет необходимости различать все вариации размера и формы головки или различные дефекты средней и основной части. Даже если лаборатория регистрирует только долю идеальных сперматозоидов, лаборант должен уметь выявлять все отклонения от нормы. Морфологическая оценка должна проводиться в отношении каждого оцениваемого сперматозоида в нескольких систематически отобранных полях предметного стекла, с тем чтобы предотвратить необъективный отбор конкретных сперматозоидов.

Рекомендуется начинать с осмотра мазка, например, при общем увеличении $\times 400$ (под световым микроскопом), с тем чтобы получить общее представление о распределении и внешнем виде сперматозоидов, других клеток, дебриса и т.д.

Детальная оценка проводится с использованием объектива светового микроскопа с масляной иммерсией $\times 100$ и окуляра не менее $\times 10$. Для получения наилучшего изображения в микроскопе необходимо использовать иммерсионное масло (показатель преломления (ПП) $\sim 1,5$).

1. Оцените все сперматозоиды в каждом поле зрения, перемещаясь от одного микроскопического поля к другому.

- Оценивайте только целые сперматозоиды (те, у которых есть головка и хвост). Не включайте незрелые клетки в подсчет сперматозоидов. Головки без хвостов следует подсчитывать отдельно и отмечать в отчете, если их число превышает 20 на 100 сперматозоидов.

- Не оценивайте поля со сперматозоидами, которые перекрываются или лежат на боку. Сперматозоиды в таких полях оцениваются только в том случае, если все поля имеют такую проблему, и тогда необходим дополнительный комментарий в отчете.

2. Оцените не менее 200 сперматозоидов для обеспечения приемлемо низкой ошибки отбора.

3. Подсчитайте число типичных, или нормальных, сперматозоидов и аномалий в четырех областях с помощью лабораторного счетчика.

4. Рассчитайте:

- доли типичных форм и аномалий в различных областях; и
- ИТЗ (сумму всех аномалий, разделенную на сумму аномальных сперматозоидов, что всегда дает результат между 1,00 и 4,00). При расчете ИТЗ на один аномальный сперматозоид приходится максимум четыре дефекта: по одному на головку, среднюю часть и основную часть и один на избыточную остаточную цитоплазму.

5. Укажите процентную долю типичных форм с точностью до ближайшего целого числа, а также ИТЗ с двумя десятичными знаками.

Рис. 2.12. Мазок 1 с окрашиванием по Папаниколау

Мазок 1

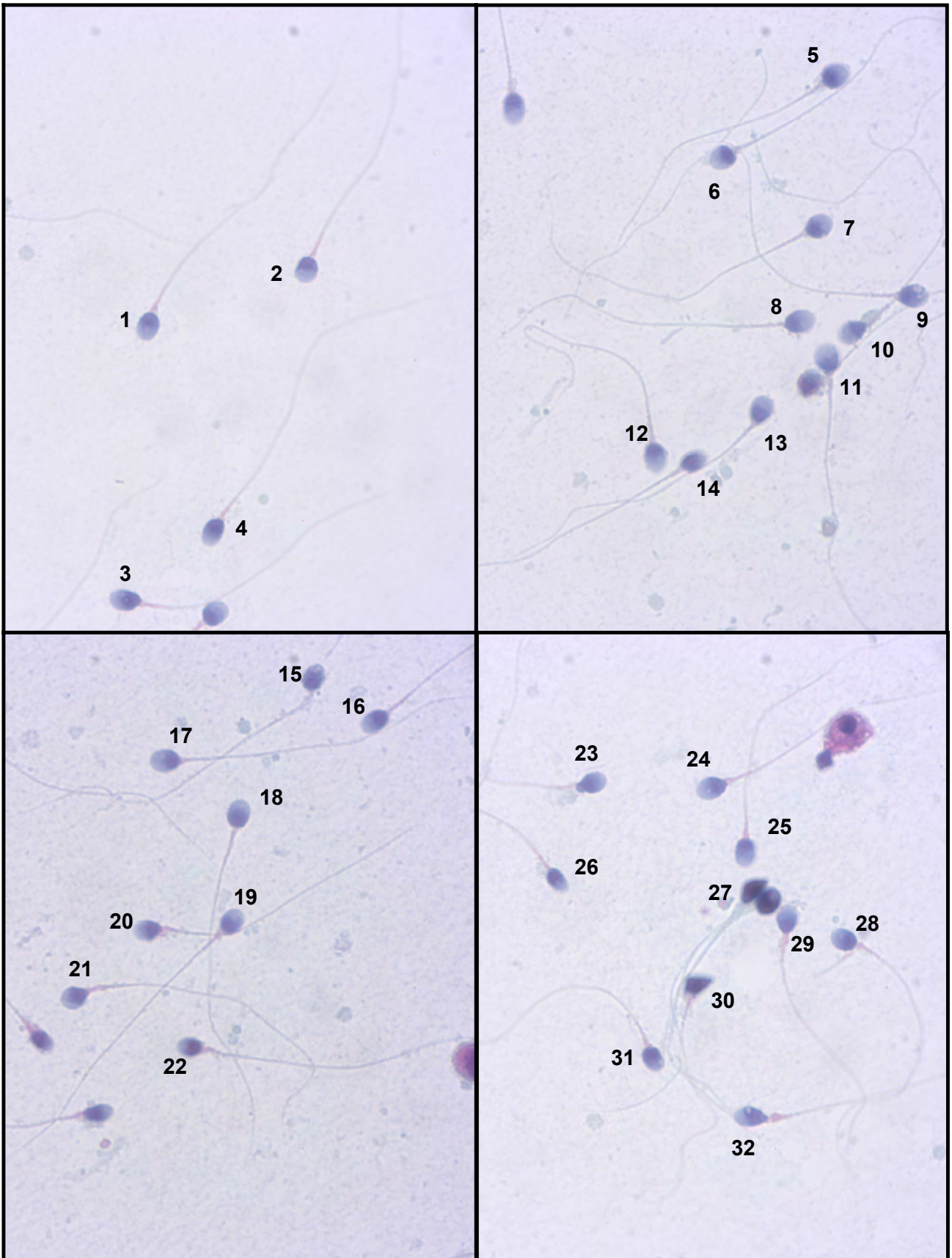
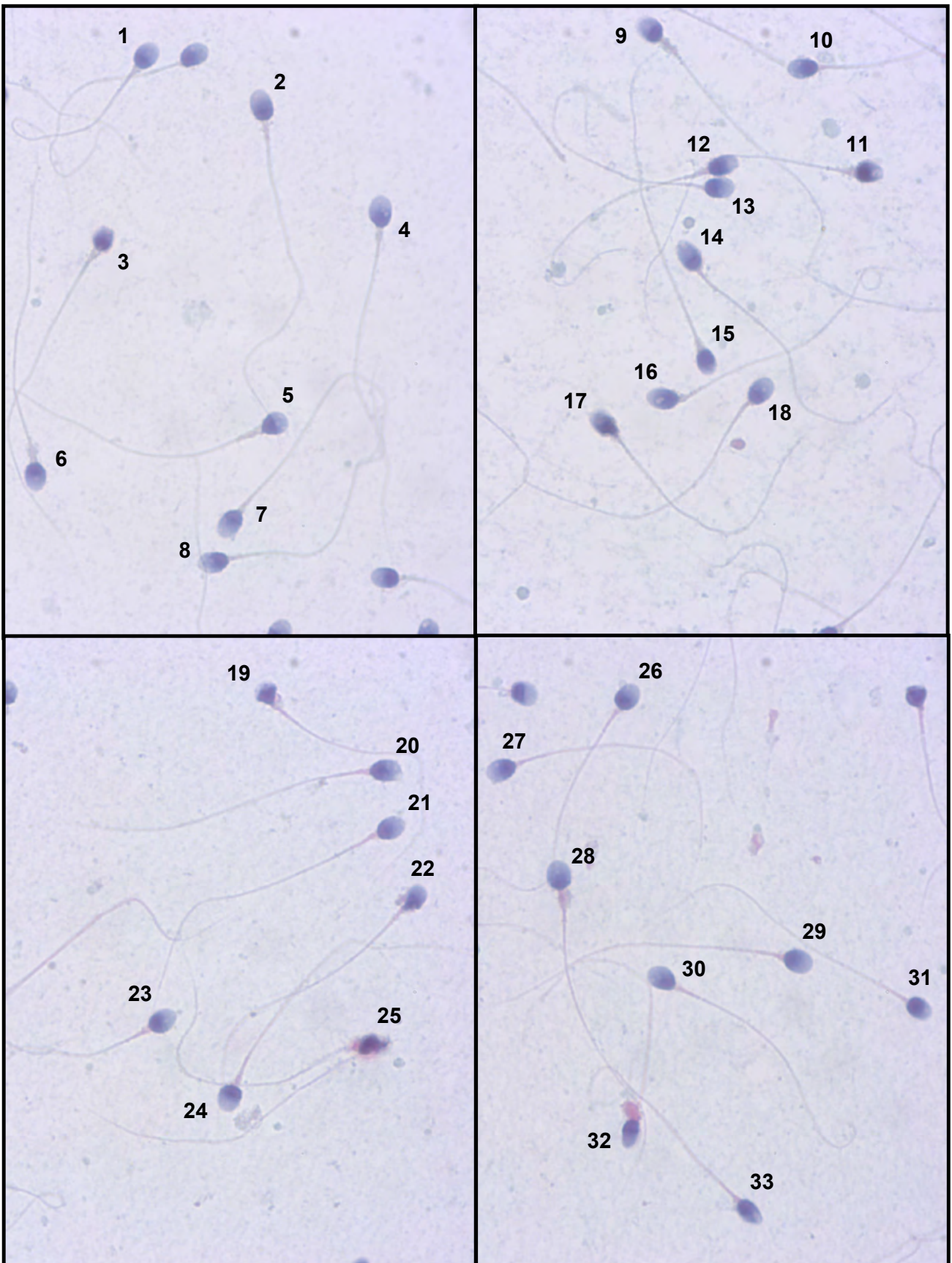


Таблица 2.7 Мазок 1 с окрашиванием по Папаниколау

	Форма головки	Другие комментарии в отношении головки	Комментарии в отношении средней части	Комментарии в отношении основной части	Общая классификация сперматозоидов
1	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
2	аномальная	аморфная	нормальная	нормальная	аномальный
3	аномальная	аморфная	утолщенная	нормальная	аномальный
4	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
5	аномальная	не овальная	утолщенная	нормальная	аномальный
6	аномальная	не овальная	нормальная	нормальная	аномальный
7	аномальная	вакуоли в постакросомной области	утолщенная	нормальная	аномальный
8	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
9	аномальная	вакуоли	нормальная	нормальная	аномальный
10	аномальная	не овальная	утолщенная	нормальная	аномальный
11	аномальная	не овальная	утолщенная	нормальная	
12	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
13	аномальная		утолщенная / изогнутая	нормальная	аномальный
14	аномальная	маленькая	нормальная	нормальная	аномальный
15	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
16	аномальная		нормальная	Н/П	аномальный
17	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
18	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
19	нормальная		утолщенная	нормальная	аномальный
20	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
21	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
22	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
23	аномальная		утолщенная	Н/П	аномальный
24	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
25	нормальная		утолщенная	нормальная	аномальный
26	аномальная	коническая	утолщенная	Н/П	аномальный
27	аномальная	не овальная	утолщенная	нормальная	аномальный
28	нормальная		утолщенная	нормальная	нормальный
29	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
30	аномальная	не овальная	утолщенная	двойная	аномальный
31	аномальная		асимметричная	нормальная	аномальный
32	аномальная	не овальная / вакуоли в постакросомной области	нормальная	нормальная	аномальный

Рис. 2.13 Мазок 2 с окрашиванием по Папаниколау

Мазок 2



1. Введение

2. Базовое исследование

3. Расширенное исследование

4. Углубленные исследования

5. Методы подготовки сперматозоидов

6. Криоконсервация сперматозоидов

7. Обеспечение качества и контроль качества

8. Приложения

9. Справочная литература

Таблица 2.8 Мазок 2 с окрашиванием по Папаниколау

	Форма головки	Другие комментарии в отношении головки	Комментарии в отношении средней части	Комментарии в отношении основной части	Общая классификация сперматозоидов
1	нормальная		утолщенная	нормальная	аномальный
2	аномальная		нормальная	нормальная	нормальный
3	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
4	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
5	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
6	нормальная		утолщенная	нормальная	аномальный
7	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
8	аномальная		нормальная	асимметричная	аномальный
9	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
10	аномальная		нормальная	Н/П	аномальный
11	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
12	аномальная		утолщенная	асимметричная	аномальный
13	нормальная		нормальная	Н/П	аномальный
14	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
15	аномальная	маленькая	утолщенная / асимметричная	нормальная	аномальный
16	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
17	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
18	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
19	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
20	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
21	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
22	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
23	аномальная		утолщенная	аномальная	аномальный
24	аномальная	слишком широкая	утолщенная	аномальная	аномальный
25	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
26	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
27	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
28	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
29	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
30	аномальная	маленькая	нормальная	нормальная	аномальный
31	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
32	аномальная		утолщенная	асимметричная	аномальный
33	аномальная	коническая	утолщенная	нормальная	аномальный

Рис. 2.14 Мазок 3 с окрашиванием по Папаниколау

Мазок 3

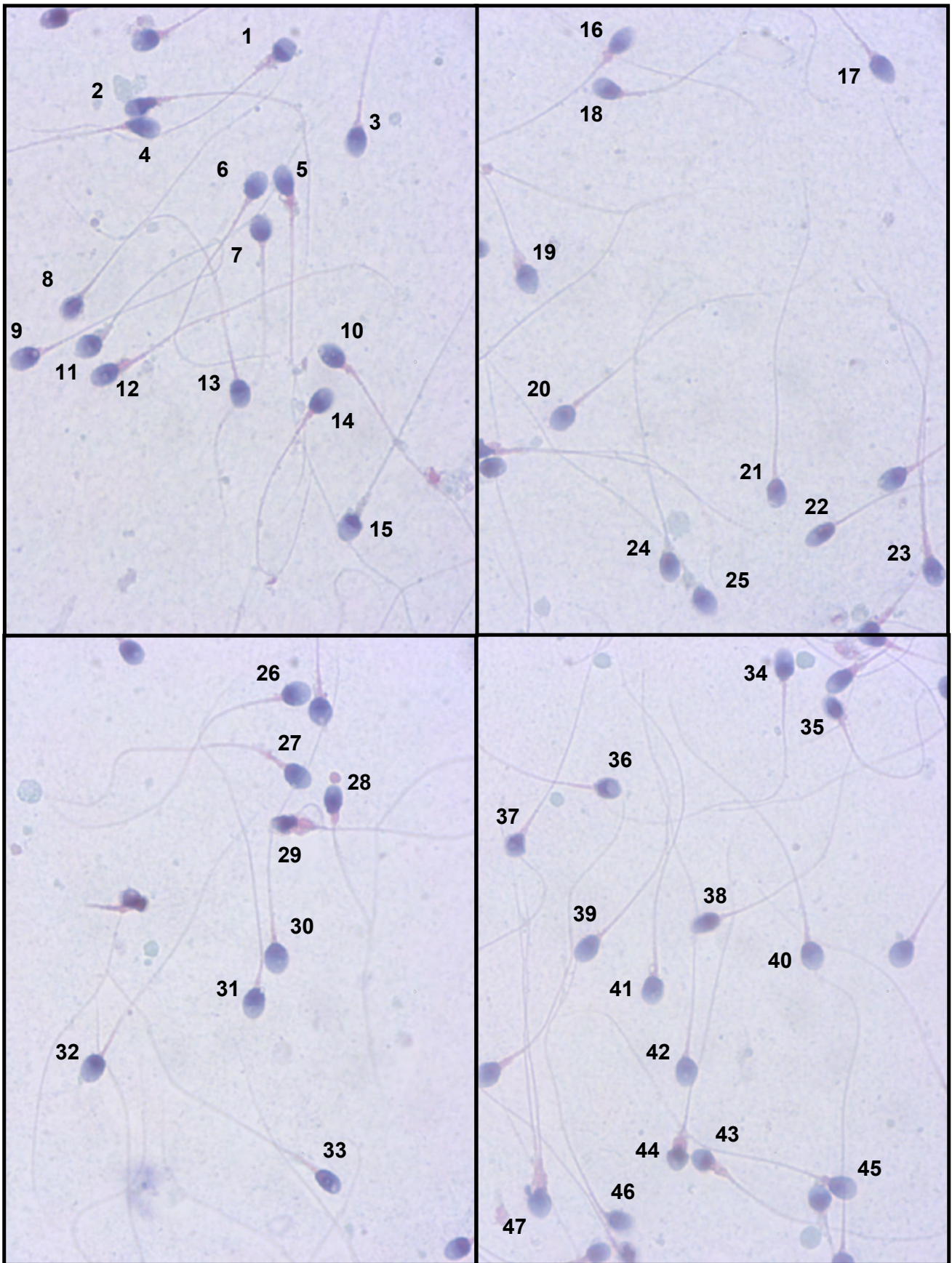


Таблица 2.9 Мазок 3 с окрашиванием по Папаниколау

	Форма головки	Другие комментарии в отношении головки	Комментарии в отношении средней части	Комментарии в отношении основной части	Общая классификация сперматозоидов
1	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
2	аномальная		утолщенная	изогнутая	аномальный
3	аномальная		утолщенная / асимметричная	Н/П	аномальный
4	аномальная		утолщенная	Н/П	аномальный
5	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
6	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
7	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
8	аномальная	маленькая	нормальная	нормальная	аномальный
9	аномальная	вакуоли в постакросомной области	утолщенная	нормальная	аномальный
10	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
11	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
12	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
13	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
14	нормальная		утолщенная	нормальная	аномальный
15	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
16	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
17	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
18	аномальная		нормальная	Н/П	аномальный
19	аномальная		утолщенная	Н/П	аномальный
20	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
21	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
22	аномальная	коническая	нормальная	нормальная	аномальный
23	аномальная		утолщенная	двойная	аномальный
24	аномальная	маленькая	утолщенная	нормальная	аномальный
25	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
26	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
27	нормальная		утолщенная	нормальная	аномальный
28	аномальная		утолщенная	изогнутая	аномальный
29	аномальная	маленькая	утолщенная	нормальная	аномальный
30	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
31	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
32	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
33	аномальная	коническая	нормальная	нормальная	аномальный
34	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
35	аномальная	маленькая	утолщенная	нормальная	аномальный
36	аномальная	маленькая	нормальная	нормальная	аномальный

	Форма головки	Другие комментарии в отношении головки	Комментарии в отношении средней части	Комментарии в отношении основной части	Общая классификация сперматозоидов
37	аномальная	маленькая	нормальная	нормальная	аномальный
38	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
39	аномальная	коническая	нормальная	нормальная	аномальный
40	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
41	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
42	аномальная		асимметричная	нормальная	аномальный
43	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
44	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
45	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
46	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
47	аномальная		утолщенная	двойная	аномальный

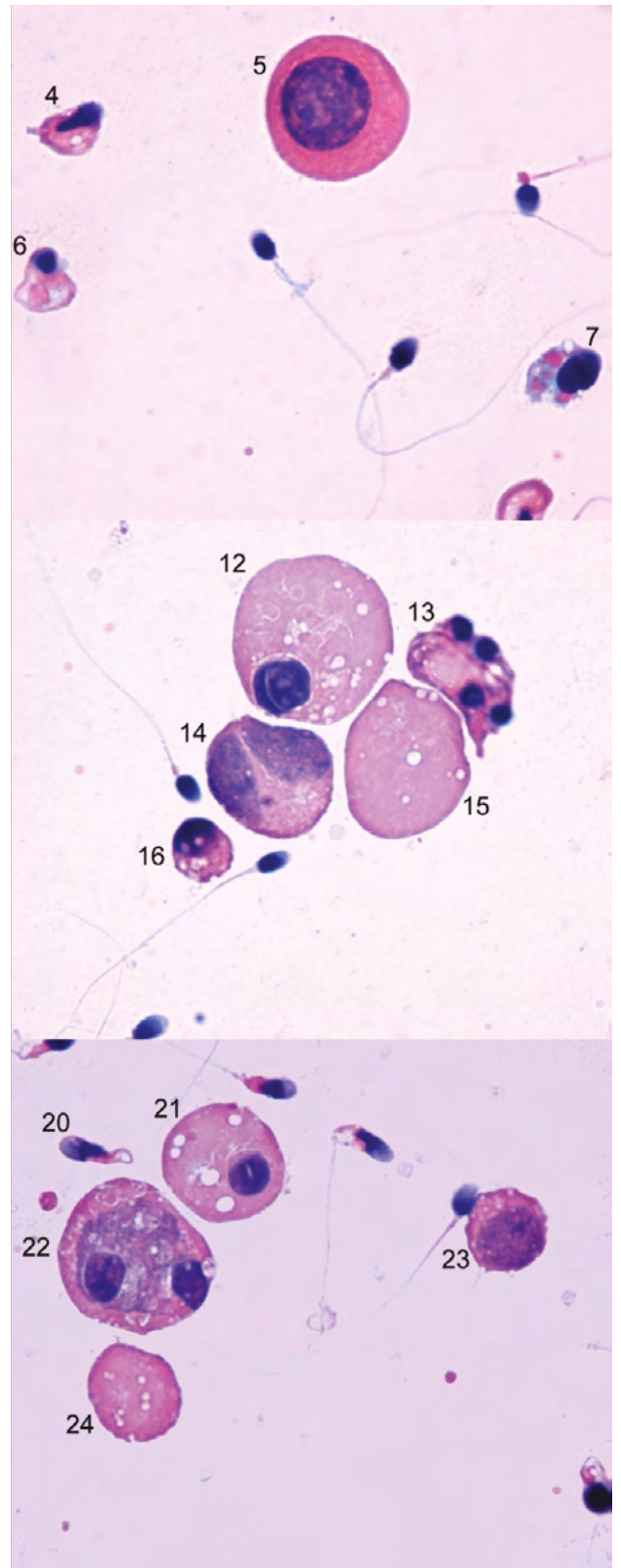
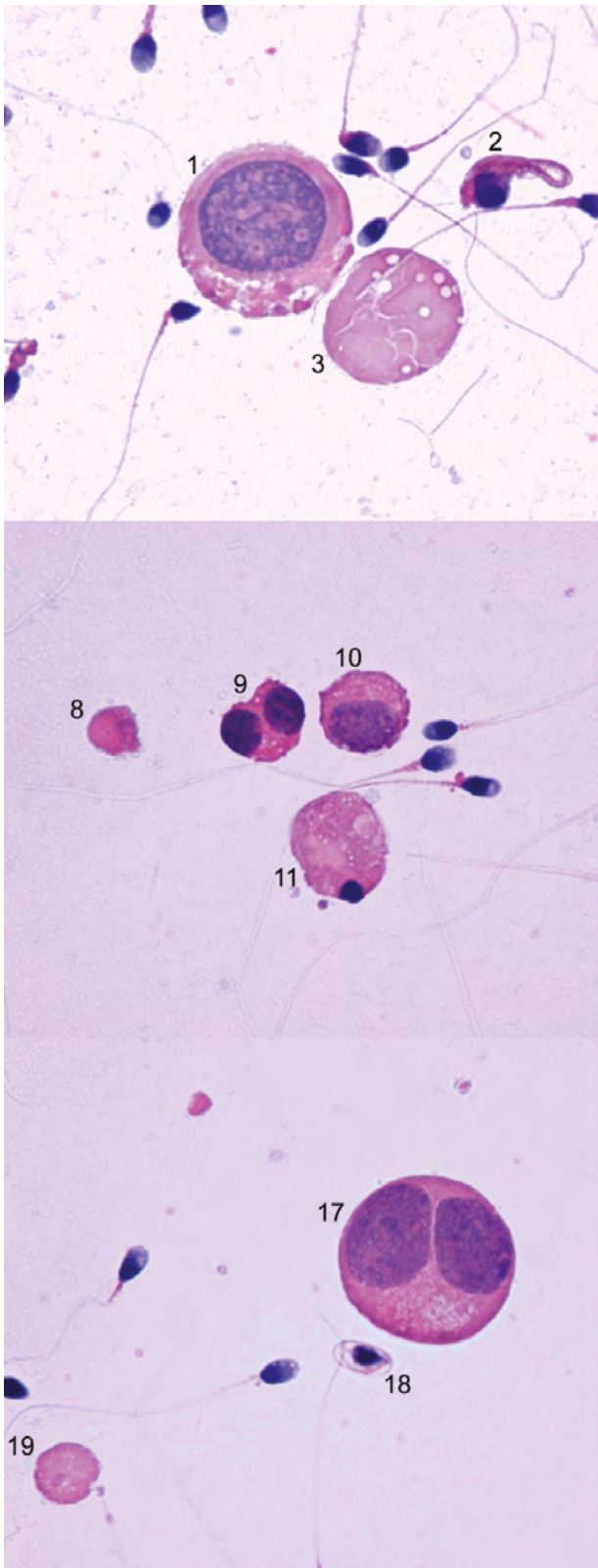
Таблица 2.10 Мазок 4 с окрашиванием по Папаниколау

Клетка	Тип клетки	Клетка	Тип клетки	Клетка	Тип клетки
1	макрофаг	9	делящаяся сперматида	17	делящийся сперматоцит
2	аномальный сперматозоид	10	сперматоцит	18	аномальный сперматозоид
3	цитоплазма	11	дегенерирующая сперматида	19	цитоплазма
4	аномальный сперматозоид	12	сперматида	20	аномальный сперматозоид
5	сперматоцит	13	дегенерирующая сперматида	21	сперматида
6	аномальный сперматозоид	14	делящийся сперматоцит	22	фагоцитирующий макрофаг
7	аномальный сперматозоид? свободная головка на цитоплазме?	15	цитоплазма	23	сперматоцит
8	цитоплазма	16	дегенерирующая сперматида	24	цитоплазма

Таблица 2.11 Мазок 5 с окрашиванием по Папаниколау

Клетка	Тип клетки	Клетка	Тип клетки	Клетка	Тип клетки
1	макрофаг	8	дегенерирующая сперматида?	13	дегенерирующая сперматида
2	аномальный сперматозоид	9	дегенерирующая сперматида	14	дегенерирующая сперматида
3	(делящаяся) сперматида	10	дегенерирующая сперматида	15	дегенерирующая сперматида
4	(делящаяся) сперматида	11	макрофаг	16	макрофаг
5	цитоплазма	12	дегенерирующая сперматида		
6	не классифицирован				
7	дегенерирующая сперматида				

Рис. 2.15 Мазок 4 с окрашиванием по Папаниколау



1. Введение

2. Базовое исследование

3. Расширенное исследование

4. Углубленные исследования

5. Методы подготовки сперматозоидов

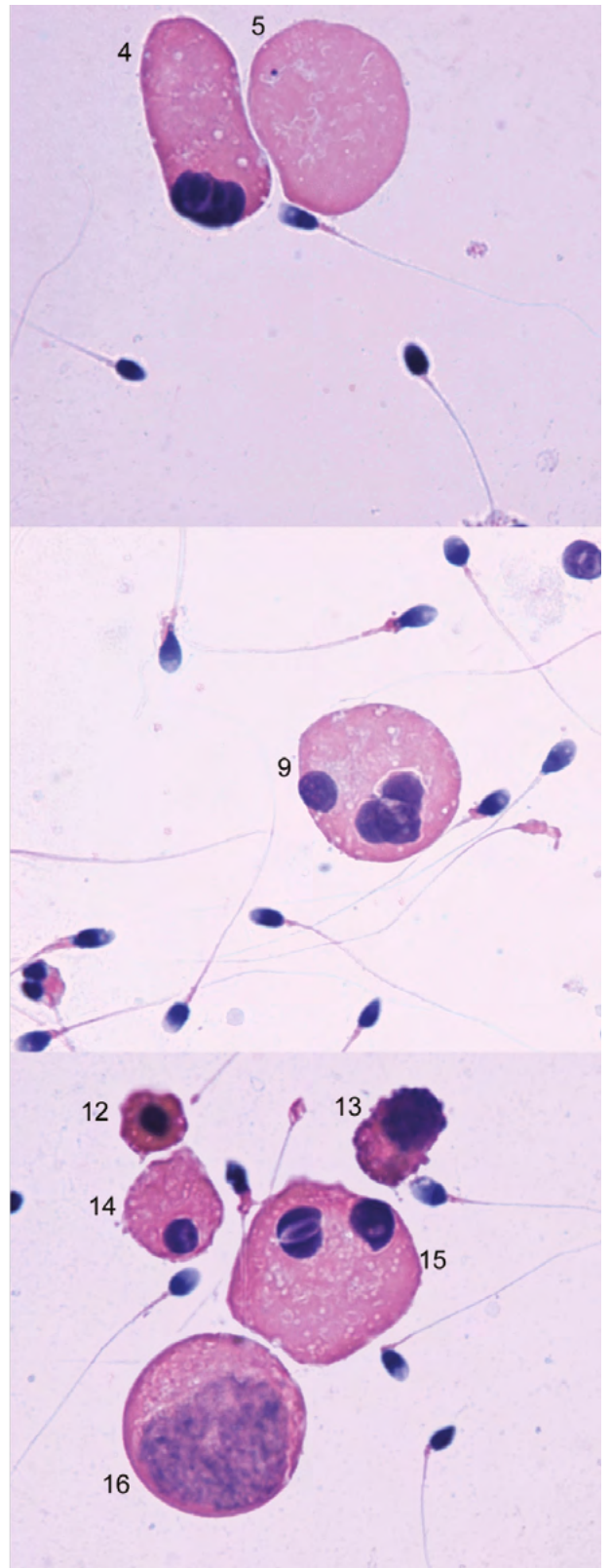
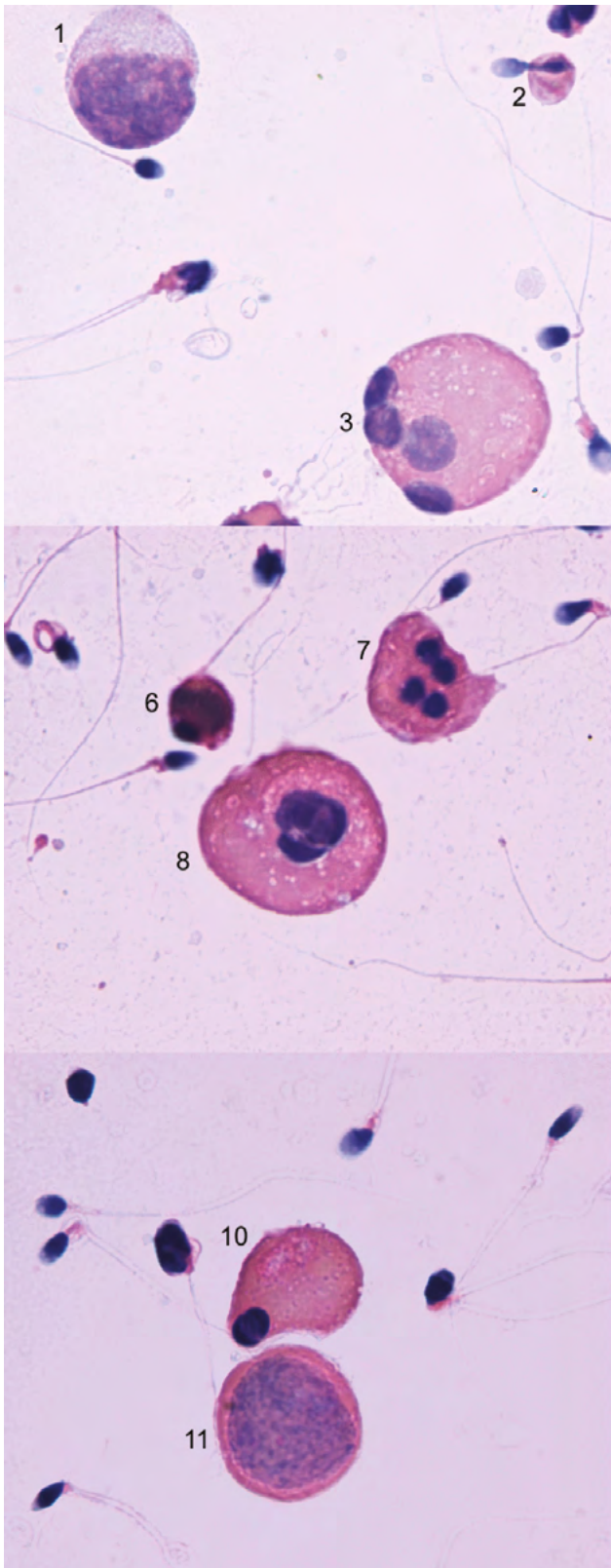
6. Криоконсервация сперматозоидов

7. Обеспечение качества и контроль качества

8. Приложения

9. Справочная литература

Рис. 2.16 Мазок 5 с окрашиванием по Папаниколау



1. Введение

2. Базовое исследование

3. Расширенное исследование

4. Углубленные исследования

5. Методы подготовки сперматозоидов

6. Криоконсервация сперматозоидов

7. Обеспечение качества и контроль качества

8. Приложения

9. Справочная литература

2.5 Дополнительная информация и комментарии

2.5.1 Справочная информация для оценки объема эякулята

- Объем, измеренный с помощью мерной пипетки, всегда будет подвержен потере 0,3–0,9 мл (50, 51, 127). Кроме того, внутри волюметрической пипетки могут находиться невидимые пузырьки воздуха, что может приводить к завышенной оценке объема эякулята. К тому же, часть объема теряется в самой пипетке, что может вызывать трудности при проведении других оценок образцов эякулята малого объема.
- Малый объем эякулята характерен при обструкции на уровне семявыбрасывающего протока или врожденном двустороннем отсутствии семявыносящих протоков (ВДОСП) (128-131), патологии, при которой семенные пузырьки также плохо развиты.
- Малый объем эякулята может быть также результатом проблем, возникших при сборе образца (потеря части эякулята), частичной ретроградной эякуляции или андрогенной недостаточности.
- Большой объем эякулята может свидетельствовать об активной экссудации в случаях активного воспаления добавочных желез.

2.5.2 Проблемы с разжижением

- Иногда образцы могут не разжижаться, что делает диагностическую оценку эякулята практически невозможной. В этих случаях дополнительная обработка, механическое перемешивание или воздействие ферментами могут способствовать проведению дальнейших оценок, но эти процедуры оказывают воздействие на биохимические показатели семенной плазмы, подвижность сперматозоидов и их морфологию, поэтому их использование необходимо регистрировать. При расчете концентрации сперматозоидов необходимо учитывать разведение эякулята культуральной средой. Для достижения максимальной точности пипетирование эякулята следует проводить методом прямого вытеснения.
- Некоторые образцы можно подвергать разжижению путем добавления равного объема физиологической среды или фосфатно-солевого буферного раствора Дюльбекко (см. [раздел 8.4.5 на стр. 265](#)) с последующим повторным осторожным пипетированием. Но добавление культуральной среды изменит подвижность и концентрацию сперматозоидов, а также биохимические маркеры.
- Неоднородность образца можно уменьшить путем его многократного (6–10 раз) осторожного пропускания через иглу с тупым концом 18-го калибра (внутренний диаметр 0,84 мм) или 19-го калибра (внутренний диаметр 0,69 мм), прикрепленную к шприцу. Однако это не рекомендуется, так как силы сдвига могут повредить сперматозоиды и тем самым негативно повлиять на целостность ДНК (132).
- Добавление бромелайна, протеолитического фермента широкого спектра действия (ЕС 3.4.22.32), может способствовать разжижению, но изменит как биохимические маркеры, так и подвижность сперматозоидов. Приготовьте

10 МЕ/мл бромелайна в фосфатно-солевом буферном растворе Дюльбекко (**раздел 8.4.5 на стр. 265**); он трудно растворяется, но при перемешивании основная часть должна раствориться в течение 15–20 минут. Разведите эякулят 1+1 (1 : 2) в 10 МЕ/мл бромелайна, перемешайте с помощью наконечника пипетки и инкубируйте при 37°C в течение 10 минут. Тщательно перемешайте образец перед его дальнейшим исследованием.

2.5.3 Альтернативные оценки вязкости

- В качестве альтернативы вязкость можно оценить путем введения в образец стеклянной палочки и наблюдения за длиной нити, которая образуется при извлечении палочки.
- В отличие от частично не разжиженного образца вязкий образец эякулята обладает однородной клейкостью, и его консистенция не меняется со временем. Высокая вязкость может препятствовать правильной оценке подвижности и концентрации сперматозоидов, обнаружению антиспермальных антител и оценке биохимических маркеров. Для снижения вязкости используются те же методы, что и для решения проблем с разжижением (**раздел 2.5.2 на стр. 72**), поэтому они будут влиять на некоторые аспекты характеристик эякулята. Даже если вязкость может быть улучшена, это повлияет на результаты исследования эякулята.

2.5.4 pH эякулята

- pH эякулята без сперматозоидов ниже 7,0 может указывать на врожденное двустороннее отсутствие семявыносящих протоков (129-131, 133), а из-за общего эмбрионального происхождения семенные пузырьки могут также отсутствовать или быть плохо развиты, что приводит к малому объему и низкому pH.
- В случае вязких образцов pH небольшой аликвоты эякулята можно измерить с помощью pH-метра, предназначенного для измерения pH вязких растворов (134).

2.5.5 Перемешивание образца

- В качестве альтернативы перемешивание может быть обеспечено путем всасывания образца ~10 раз в одноразовую пластиковую (при необходимости стерильную) пипетку с широким отверстием (диаметр отверстия около 1,5 мм). При этом необходимо следить за тем, чтобы не образовывались пузырьки воздуха. Не перемешивайте образец с помощью вихревого миксера, поскольку это может привести к повреждению сперматозоидов.

2.5.6 Влажный препарат – принципы исследования

- Объем эякулята и параметры покровного стекла (размер и вес) должны быть отрегулированы, с тем чтобы получить препарат фиксированной глубины около 20 мм, что позволяет сперматозоидам свободно плавать (135, 136). Более глубокий препарат может вызвать трудности, поскольку фокусная глубина микроскопа



не будет охватывать всю глубину препарата, в результате чего сперматозоиды будут появляться и исчезать по мере их перемещения в фокус и из фокуса.

- Глубина препарата (D , мкм) получается путем деления объема образца (V , мкл = мм³) на площадь, на которой он распределен (A , мм²): $D = V/A$. Таким образом, объем образца 10 мл, помещенный на чистое предметное стекло и покрытый покровным стеклом 22 мм × 22 мм (площадь 484 мм²), обеспечивает глубину камеры 20,7 мкм.

2.5.6.1 Вероятность наличия необнаруженных сперматозоидов при исследовании влажных препаратов

Если в одном или двух влажных препаратах сперматозоиды не обнаружены, существует низкая вероятность того, что сперматозоиды все еще могут присутствовать в эякуляте, что частично зависит от общего объема эякулята. Вероятность наличия определенного числа необнаруженных сперматозоидов можно оценить, рассчитав доверительный интервал значения на основе распределения Пуассона (137), – это означает, что при необнаружении сперматозоидов во влажном препарате ожидается, что число сперматозоидов, обнаруженных во всем эякуляте, будет меньше числа, указанного в таблице 2.12, с вероятностью 95% и 99,5% соответственно. В таблице приведены результаты исследования различных объемов и одного или двух влажных препаратов объемом 10 мкл.

Таблица 2.12 Вероятность наличия необнаруженных сперматозоидов при исследовании влажных препаратов

Объем эякулята (в мл)	Необнаруженные сперматозоиды (95%-ный доверительный интервал)		Необнаруженные сперматозоиды (99,5%-ный доверительный интервал)	
	10 мкл	20 мкл	10 мкл	20 мкл
1	300	150	530	265
2	600	300	1060	530
4	1200	600	2120	1060
8	2400	1200	4240	2120

2.5.6.2 Вероятность наличия необнаруженных сперматозоидов после центрифугирования

Если в осадке после центрифугирования одного или двух влажных препаратов сперматозоиды не обнаружены, существует низкая вероятность того, что сперматозоиды все еще могут присутствовать в эякуляте, что отчасти зависит от общего объема эякулята. Вероятность наличия определенного числа необнаруженных сперматозоидов можно оценить, рассчитав доверительный интервал значения на основе распределения Пуассона (137), – это означает, что при необнаружении сперматозоидов во влажном препарате ожидается, что число сперматозоидов, обнаруженных во всем эякуляте, будет меньше числа, указанного в таблице 2.12, с вероятностью 95% и 99,5% соответственно. В таблице приведены результаты исследования различных объемов и одного или двух влажных препаратов объемом 10 мкл. В таблице концентрация при центрифугировании была рассчитана как 1 мл на 50 мкл (20×).

Таблица 2.13 Вероятность наличия необнаруженных сперматозоидов после центрифугирования

Объем эякулята (в мл)	Необнаруженные сперматозоиды (95%-ный доверительный интервал)		Необнаруженные сперматозоиды (99,5%-ный доверительный интервал)	
	10 мкл	20 мкл	10 мкл	20 мкл
1	15	8	27	14
2	30	15	53	27
4	60	30	106	53
8	120	60	212	106

2.5.7 Агглютинация сперматозоидов

- Наличие агглютинации не является достаточным основанием для вывода об иммунологической причине бесплодия, но свидетельствует о наличии антиспермальных антител; может потребоваться дальнейшее тестирование (**раздел 3.7 на стр. 134**).
- Тяжелая степень агглютинации может повлиять на оценку подвижности и концентрации сперматозоидов.

2.5.8 Камеры для подсчета сперматозоидов

- Сперматозоиды легко прилипают к стеклянным поверхностям. Поэтому необходима тщательная очистка.
 - Вымойте камеру гемоцитометра и покровное стекло водой с моющим средством.
 - Аккуратное протирание поверхности сетки позволит удалить все остатки сперматозоидов из предыдущего образца.
 - После использования тщательно просушите салфеткой, поскольку любые высохшие остатки могут препятствовать загрузке.
 - В соответствии с существующими правилами охраны труда и техники безопасности необходимо принимать меры для предотвращения риска заражения потенциально опасными инфекциями, например, путем замачивания многоразовых камер и покровных стекол в дезинфицирующем средстве до следующего дня (**раздел 8.2.5 на стр. 255**).
- Для определения концентрации сперматозоидов существуют одноразовые камеры (86, 138–141), но результаты, полученные при использовании таких камер, могут отличаться от результатов, полученных в усовершенствованном гемоцитометре Нейбауэра.
- В неглубоких камерах (обычно 20 мкм), заполняемых под действием капиллярных сил, распределение сперматозоидов не является равномерным под воздействием потока (142, 143). Вероятно это можно исправить (143), но использование таких камер не рекомендуется (144).

2.5.9 Площадь и объем поля зрения микроскопа высокого разрешения

Объем эякулята, наблюдаемый в каждом микроскопическом поле, зависит от глубины препарата и площади поля (πr^2 , где π приблизительно равно 3,142, а r – радиус поля зрения микроскопа) и от глубины камеры (20,7 мкм для влажного препарата). Диаметр поля зрения микроскопа может быть измерен с помощью микрометра предметного столика или оценен путем деления диаметра апертуры окуляра на увеличение объектива.

При объективе $\times 40$ и окуляре $\times 10$ с апертурой 20 мм поле зрения микроскопа имеет диаметр около 500 мкм (20 мм/40). В этом случае $r = 250$ мкм, $r^2 = 62\,500$ мкм², $\pi r^2 = 196\,375$ мкм², а объем составляет 4 064 962 мкм³, или около 4 нл.

При объективе $\times 20$ и окуляре $\times 10$ с апертурой 20 мм поле зрения микроскопа имеет диаметр около 1000 мкм (20 мм/20). В этом случае $r = 500$ мкм, $r^2 = 250\,000$ мкм², $\pi r^2 = 785\,500$ мкм², а объем составляет 16 259 850 мкм³, или около 16 нл.

2.5.10 Проверка на токсичность контейнеров для сбора эякулята

Отберите не менее пяти образцов эякулята с высокой концентрацией и хорошей подвижностью сперматозоидов. Образцы должны быть собраны в известные безопасные контейнеры (контроль), а затем половину каждого образца следует перенести в неизвестные контейнеры (тест). Оцените подвижность сперматозоидов (**раздел 2.4.6 на стр. 27**) сразу же и через 4 часа. Такой промежуток времени предлагается на основании того, что он вдвое превышает возможное время воздействия контейнера на эякулят. Следует использовать нативные образцы эякулята, поскольку именно они подвергаются воздействию. Если в каждой временной точке нет различий между контрольной и тестовой оценками ($P > 0,05$ по результатам парного Т-теста), можно считать, что тестовые контейнеры нетоксичны для сперматозоидов и соответствуют требованиям для сбора эякулята. Другие предметы, используемые в диагностическом исследовании эякулята, такие как наконечники пипеток, должны быть проверены на предмет воздействия, при этом время воздействия должно быть должным образом учтено.

2.5.11 Стерильный сбор эякулята для применения вспомогательных репродуктивных технологий и криоконсервации

В этих случаях сбор эякулята выполняется так же, как и сбор эякулята в диагностических целях, но контейнеры для образцов, наконечники пипеток и пипетки для перемешивания должны быть стерильными. Нормативные требования могут различаться, но часто требуется, чтобы процедуры подготовки эякулята способствовали снижению риска загрязнения микроорганизмами и другими частицами. Часто требуется обеспечить чистое помещение (вытяжной шкаф с ламинарным потоком воздуха) и контролируемое качество воздуха.

2.5.12 Стерильный сбор эякулята для микробиологического исследования

Хорошо известно, что получение полезной информации из микробиологических культур эякулята является сложной задачей. Поэтому важно свести к минимуму микробиологическое загрязнение из источников, отличных от семенной жидкости (например, комменсальные микроорганизмы с кожи). Контейнеры для образцов, наконечники пипеток и пипетки для перемешивания должны быть стерильными. В идеале аликвоты для микробиологического исследования следует брать до проведения каких-либо других оценок эякулята. Время между сбором образца эякулята и началом исследования в микробиологической лаборатории не должно превышать 3 часов.

Мужчина должен:

- помочиться;
- вымыть руки и пенис с мылом для снижения риска загрязнения образца комменсальными организмами с кожи;
- смыть мыло;
- вытереть руки и пенис чистым одноразовым полотенцем; и
- собрать эякулят в стерильный контейнер.

2.5.13 Альтернативные тесты на жизнеспособность

2.5.13.1 Тест на жизнеспособность с использованием только эозина

Это простой и быстрый метод, но влажные препараты нельзя хранить для контроля качества, а для получения надежных результатов требуется оптика с отрицательным фазовым контрастом. Найти такую оптику сложно, а при более распространенном положительном фазовом контрасте различить бледно-розовые головки трудно.

Подготовка реагентов

1. 0,9%-ный (w/v) NaCl: растворите 0,9 г NaCl в 100 мл очищенной воды.
 2. 0,5%-ный (w/v) эозин Y: растворите 0,5 г эозина Y (цветовой индекс 45380) в 100 мл 0,9%-ного NaCl.
- Если коммерчески доступный раствор эозина является гипотоническим водным раствором, он может погубить часть сперматозоидов и привести к ложноположительным результатам (75). При применении такого раствора используйте 170 ммоль солевого раствора, с тем чтобы сделать его изотоничным эякуляту (17).

Процедура

1. Тщательно перемешайте эякулят.
2. Отберите аликвоту эякулята объемом 5 мкл и соедините с 5 мкл раствора эозина на предметном стекле микроскопа. Перемешайте образец на предметном стекле, производя вращательные движения наконечником пипетки.



3. Незамедлительно накройте покровным стеклом размером 22 мм × 22 мм и оставьте на 30 секунд.
4. Исследуйте предметное стекло с помощью оптики с отрицательным фазовым контрастом при увеличении ×200 или ×400.
5. Подсчитайте число окрашенных (мертвых) и неокрашенных (живых) клеток с помощью лабораторного счетчика.
6. Оцените 200 сперматозоидов, чтобы обеспечить приемлемо низкую ошибку выборки.
7. Рассчитайте долю живых клеток.
8. Укажите процентную долю живых сперматозоидов, округлив ее с точностью до ближайшего целого числа.

Оценка

- Живые сперматозоиды имеют белые головки, а у мертвых сперматозоидов головки окрашены в красный или розовый цвет.
- Если окрашивание ограничено только частью шейной области, а остальная часть головки не окрашена, это считается признаком «протекающей шейной мембраны», а не гибели клетки и полного разрушения мембраны. Такие клетки следует оценивать как живые.

2.5.13.2 Тест на жизнеспособность с использованием гипоосмотического набухания

В качестве альтернативы методу исключения красителя для оценки жизнеспособности можно использовать тест на гипоосмотическое набухание (145). Это целесообразно, когда необходимо избежать окрашивания сперматозоидов, например, при отборе сперматозоидов для интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ). При проведении теста на гипоосмотическое набухание предполагается, что в гипотонических растворах могут набухать только клетки с неповрежденными мембранами (живые клетки). Сперматозоиды с неповрежденными мембранами набухают в гипоосмотической среде в течение 5 минут, а все формы жгутиков стабилизируются через 30 минут (146).

- Для обычной диагностики используйте инкубацию в течение 30 минут.
- Если сперматозоиды обрабатываются для терапевтических целей, используйте инкубацию в течение 5 минут.



Подготовка реагентов

1. Раствор для набухания сперматозоидов для диагностических целей: растворите 0,735 г дигидрата цитрата натрия и 1,351 г D-фруктозы в 100 мл очищенной воды.
 - Аликвоты этого раствора объемом 1 мл можно заморозить при температуре -20°C .
2. Для сперматозоидов, предназначенных для вспомогательных репродуктивных технологий, разбавьте используемую культуральную среду стерильной очищенной водой 1+1 (1 : 2).

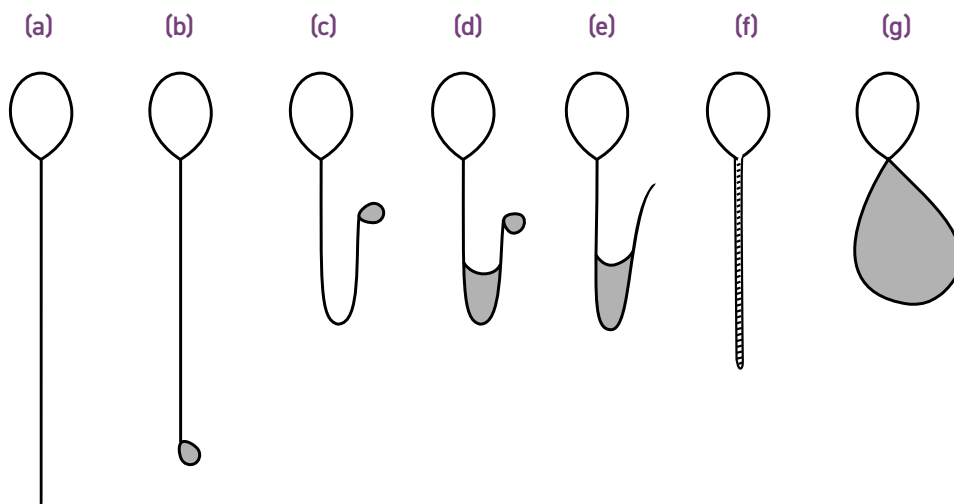
Процедура

1. Разморозьте замороженный раствор для набухания и тщательно перемешайте перед использованием.
2. Прогрейте 1 мл раствора для набухания или 1 мл разбавленной 1+1 (1 : 2) среды в закрытой микроцентрифужной пробирке при 37°C в течение 5 минут.
3. Тщательно перемешайте эякулят.
4. Отберите аликвоту эякулята объемом 100 мкл и добавьте в раствор для набухания. Осторожно перемешайте, втягивая и вытягивая его из пипетки.
5. Инкубируйте при 37°C ровно 5 минут или 30 минут (см. выше), затем перенесите аликвоту объемом 10 мкл на чистое предметное стекло и накройте покровным стеклом размером 22 мм \times 22 мм.
6. Перемешайте образец эякулята, отберите повторную аликвоту, смешайте с раствором для набухания и подготовьте предметное стекло с препаратом, как указано выше.
7. Исследуйте каждое предметное стекло под фазово-контрастным микроскопом при увеличении $\times 200$ или $\times 400$.
8. Подсчитайте число ненабухших (мертвых) и набухших (живых) клеток с помощью лабораторного счетчика.
9. Оцените 200 сперматозоидов в каждом препарате, чтобы обеспечить приемлемо низкую ошибку выборки.

Оценка

1. Набухшие сперматозоиды определяются по изменению формы клетки, на что указывает свертывание хвоста (**рис. 2.16 на стр. 71**).
2. Живые клетки различают по признакам набухания хвоста сперматозоида; оцените все формы набухших хвостов как живые сперматозоиды.

Рис. 2.17 Схематическое изображение типичных морфологических изменений сперматозоидов человека, подвергнутых гипоосмотическому стрессу



(a) = нет изменений; (b)-(g) = различные типы изменений хвоста. Набухание хвоста обозначено заштрихованной областью. Перепечатано с разрешения Джейендрана и др. (1984 г.)

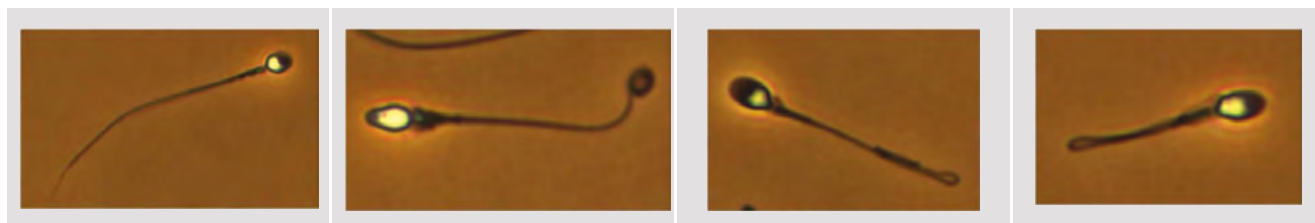
Рис. 2.18 Фотографии сперматозоидов, подвергнутых гипоосмотическому стрессу, сделанные под фазово-контрастным микроскопом

1. Нормальный хвост

2. Кончик хвоста закручен

3. <50% хвоста сложено

4. ≥50% хвоста сложено



С любезного разрешения Э. Холмса (147).

2.5.14 Альтернативные методы окрашивания для морфологической оценки

2.5.14.1 Окрашивание по Шорру

Окрашивание по Шорру позволяет получить такие же процентные доли нормальных форм, как и окрашивание по Папаниколау, но этот метод не был валидирован и оценен с использованием строгих критериев, рекомендованных ВОЗ (148). Кроме того, в рамках проведенных сравнений не оценивалось, приводит ли окрашивание по Шорру к тем же результатам, что и адаптированное к эякуляту окрашивание по Папаниколау.

Реагенты

1. Гематоксилин Харриса (см. **раздел 8.4.11.3 на стр. 269**): такой же, как и при окрашивании по Папаниколау.

2. Раствор Шорра: купите готовый или приготовьте следующим образом: растворите 4 г порошка Шорра в 220 мл теплого 50%-ного (v/v) этанола, остудите, добавьте 2,0 мл ледяной уксусной кислоты (в вытяжном шкафу) и профильтруйте.

3. Уксусный этанол: добавьте 25 мл ледяной уксусной кислоты к 75 мл 95%-ного (v/v) этанола.

4. Аммиачный этанол: добавьте 5 мл 25%-ного (v/v) гидроксида аммония к 95 мл 75%-ного (v/v) этанола.

Фиксация высушенного на воздухе мазка эякулята

Погрузите предметные стекла в уксусный этанол или 75%-ный (v/v) этанол на 1 час.

Окрашивание фиксированного мазка эякулята

Последовательно погрузите предметные стекла в следующие жидкости:

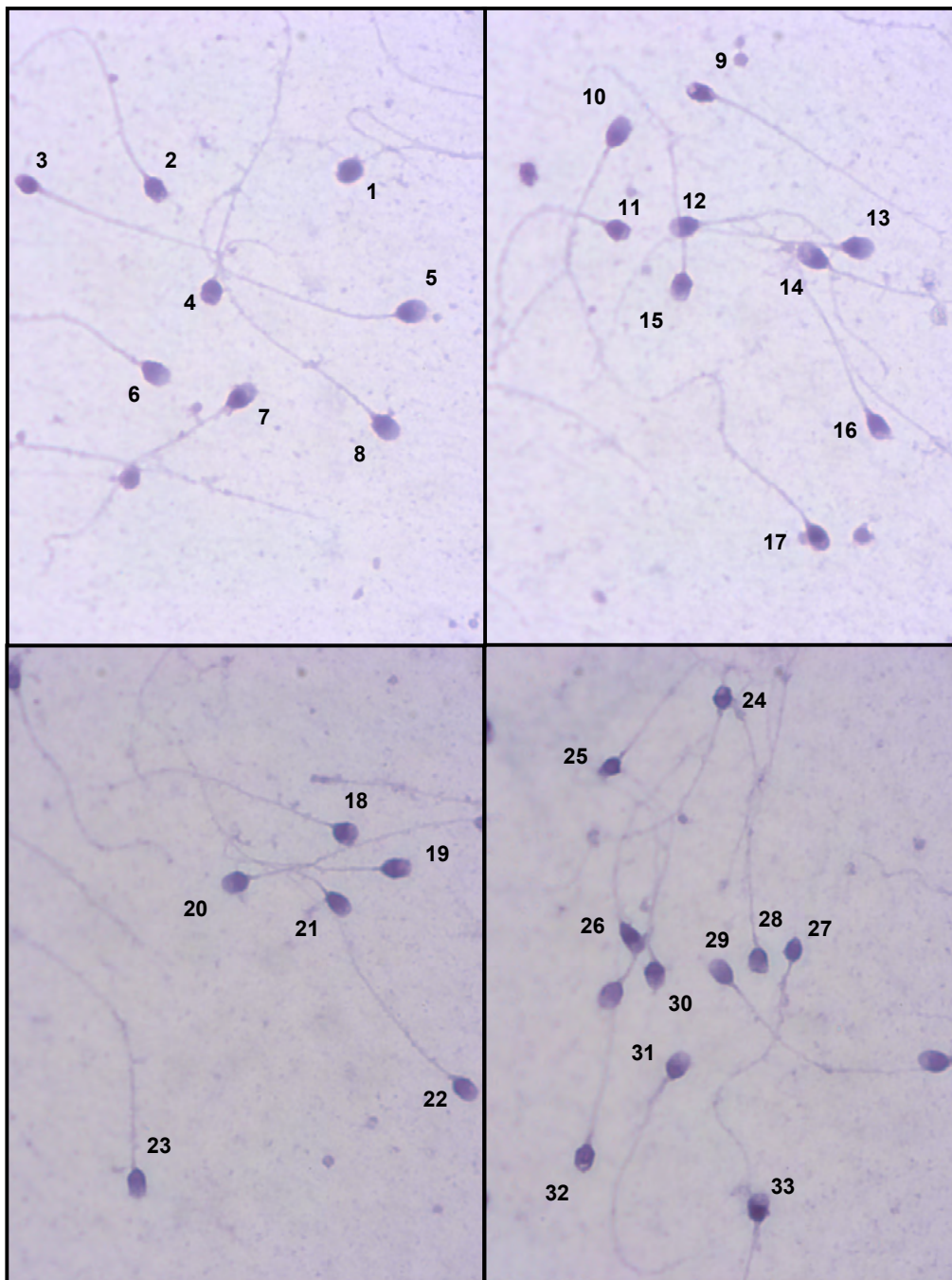
- | | |
|--------------------------|-------------------------------|
| 1. проточная вода | 12–15 погружений ⁷ |
| 2. гематоксилин | 1–2 минуты |
| 3. проточная вода | 12–15 погружений |
| 4. аммиачный этанол | 10 погружений |
| 5. проточная вода | 12–15 погружений |
| 6. 50%-ный (v/v) этанол | 5 минут |
| 7. краситель Шорра | 3–5 минут |
| 8. 50%-ный (v/v) этанол | 5 минут |
| 9. 75%-ный (v/v) этанол | 5 минут |
| 10. 95%-ный (v/v) этанол | 5 минут |

Заключение окрашенного мазка эякулята в гистологическую среду

Предметные стекла можно просматривать заключенными или не заключенными в гистологическую среду (без покровных стекол или с ними), но предметные стекла, заключенные в гистологическую среду, можно использовать для обучения и ВКК, а также для внутрилабораторного сравнения. Кроме того, при надлежащем погружении предметных стекол в среду риск загрязнения объектива микроскопа отсутствует.

⁷ Длительность одного погружения составляет примерно 1 секунду.

Рис. 2.19 Мазок с окрашиванием по Шорру



1. Введение

2. Базовое исследование

3. Расширенное исследование

4. Углубленные исследования

5. Методы подготовки сперматозоидов

6. Криоконсервация сперматозоидов

7. Обеспечение качества и контроль качества

8. Приложения

9. Справочная литература

Таблица 2.14 Мазок с окрашиванием по Шорру

	Форма головки	Другие комментарии в отношении головки	Комментарии в отношении средней части	Комментарии в отношении основной части	Общая классификация сперматозоидов
1	аномальная	нет акросомы	нормальная	нормальная	аномальный
2	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
3	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
4	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
5	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
6	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
7	аномальная		аномальная	нормальная	аномальный
8	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
9	аномальная	слишком длинная	нормальная	нормальная	аномальный
10	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
11	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
12	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
13	аномальная		аномальная	нормальная	аномальный
14	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
15	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
16	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
17	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
18	аномальная		аномальная	нормальная	аномальный
19	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
20	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
21	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
22	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
23	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
24	аномальная		аномальная	нормальная	аномальный
25	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
26	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
27	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
28	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
29	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
30	аномальная		аномальная	нормальная	аномальный
31	аномальная		аномальная	нормальная	аномальный
32	аномальная		аномальная	нормальная	аномальный
33	аномальная		аномальная	Н/П	аномальный

2.5.14.2 Быстрое окрашивание

Применение методов быстрого окрашивания может быть целесообразным, когда результаты необходимо получить в тот же день. Существует несколько наборов для дифференциального окрашивания, но, несмотря на получение схожих результатов (149), некоторые исследования указывают на необходимость установления отдельных референсных пределов из-за различий в выявляемых аномалиях (150, 151). Некоторые мазки, окрашенные с помощью быстрых процедур, имеют чрезмерную окраску фона и могут быть более низкого качества, чем мазки, окрашенные по Папаниколау. Еще более важно то, что фиксированные и окрашенные головки сперматозоидов имеют другие размеры по сравнению с окрашиванием по Папаниколау (152).

Реагенты

- Набор для быстрого окрашивания DiffQuik
- Фиксатор: 95%-ный (v/v) метанол или 1,8 мг триарилметана, растворенного в 1000 мл 95%-ного (v/v) метанола.

Фиксация высушенного на воздухе мазка эякулята

Погрузите предметные стекла в триарилметановый фиксатор на 15 секунд или в 95%-ный метанол на 1 час. Дайте стечь излишнему раствору, положив предметные стекла вертикально на абсорбирующую бумагу.

Окрашивание фиксированного мазка эякулята

Последовательно погрузите предметные стекла в следующие жидкости:

1. раствор для быстрого окрашивания 1 10 секунд
2. раствор для быстрого окрашивания 2 5 секунд
3. проточная водопроводная вода 10–15 погружений для удаления избыточного красителя

Удаляйте излишний раствор на каждом этапе, помещая предметные стекла вертикально на абсорбирующую бумагу.

Заключение окрашенного мазка эякулята в гистологическую среду

Предметные стекла можно просматривать заключенными или не заключенными в гистологическую среду (без покровных стекол или с ними), но предметные стекла, заключенные в гистологическую среду, можно использовать для обучения и ВКК, а также для внутрилабораторного сравнения. Кроме того, при надлежащем погружении предметных стекол в среду риск загрязнения объектива микроскопа отсутствует.



Рис. 2.20 Мазок с окрашиванием DiffQuik

DiffQuik

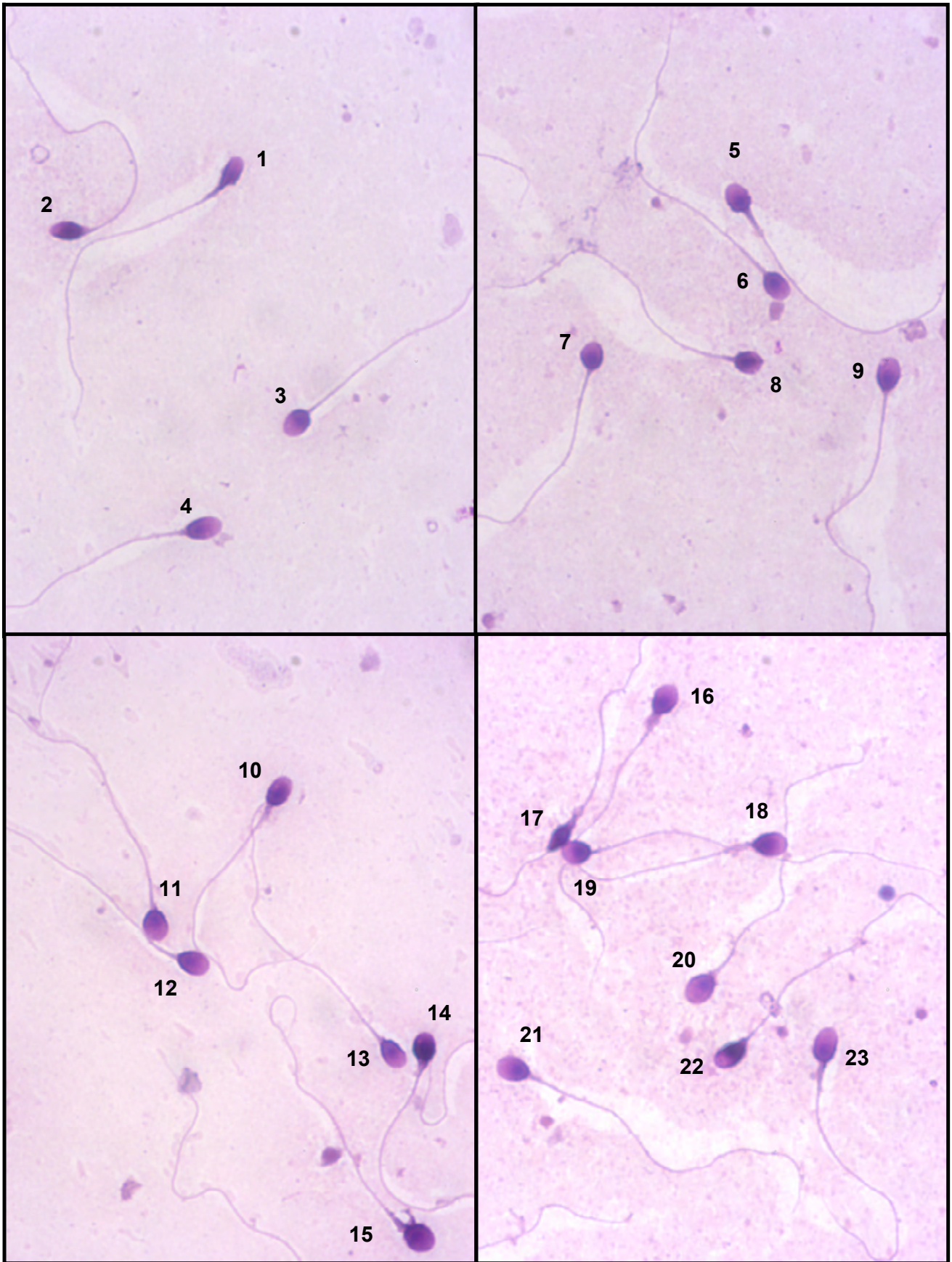


Таблица 2.15 Мазок с окрашиванием DiffQuik

	Форма головки	Другие комментарии в отношении головки	Комментарии в отношении средней части	Комментарии в отношении основной части	Общая классификация сперматозоидов
1	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
2	аномальная		утолщенная	нормальная	аномальный
3	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
4	аномальная	не овальная	нормальная	нормальная	аномальный
5	аномальная	аморфная	утолщенная	нормальная	аномальный
6	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
7	аномальная	не овальная	нормальная	нормальная	аномальный
8	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
9	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
10	аномальная	не овальная	утолщенная	нормальная	аномальный
11	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
12	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
13	аномальная	коническая	нормальная	нормальная	аномальный
14	аномальная	маленькая	утолщенная	нормальная	аномальный
15	нормальная		утолщенная	нормальная	аномальный
16	аномальная	аморфная	утолщенная	нормальная	аномальный
17	аномальная	коническая	утолщенная	нормальная	аномальный
18	нормальная		асимметричная	нормальная	аномальный
19	аномальная	не овальная	утолщенная	нормальная	аномальный
20	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
21	нормальная		нормальная	нормальная	нормальный
22	аномальная		нормальная	нормальная	аномальный
23	аномальная	не овальная	асимметричная	нормальная	аномальный

2.5.15 Статистические аспекты

2.5.15.1 Достижение подсчета 200 сперматозоидов на препарат в квадратах усовершенствованной камеры Нейбауэра

- Если при исследовании влажного препарата на одно поле зрения МВР приходится 10 сперматозоидов, то их число составит 2,5/нл и 250/центральный квадрат. Разбавление образца 1+1 (1 : 2) уменьшит фон и число сперматозоидов примерно до 125 на квадрат; оценка второго квадрата увеличит число примерно до 250, что достаточно для приемлемой ошибки выборки.

- Эти расчетные концентрации являются лишь приблизительными оценками, поскольку подсчитывается столь малое число сперматозоидов; объемы также весьма приблизительны. Концентрации, рассчитанные на основе неразбавленных препаратов, могут составлять от 30% до 130% от концентраций, рассчитанных на основе разбавленных образцов в счетных камерах.



2.5.15.2 Расчетные ошибки выборки и границы доверительного интервала в соответствии с общим числом подсчитанных сперматозоидов

- Подсчет слишком малого числа сперматозоидов даст неопределенный результат, что может иметь последствия для диагностики и терапии. Это может быть неизбежным в случае, когда сперматозоиды берутся для терапевтических целей и их число незначительно.
- Если объем эякулята небольшой и подсчитывается меньшее число сперматозоидов, чем рекомендуется, точность полученных значений будет значительно снижена. Если в каждом препарате подсчитано менее 200 сперматозоидов, укажите ошибку выборки, как указано в таблице 2.16.
- Ошибка выборки – это мера ожидаемой ошибки в результатах на основе числа наблюдений. 95%-ный доверительный интервал дает верхнюю и нижнюю границы диапазона, в котором находится истинное значение популяции, на основе числа наблюдений в исследуемой аликвоте.

Таблица 2.16 Округленные ошибки выборки (в %) и границы 95%-ного доверительного интервала в соответствии с общим числом подсчитанных сперматозоидов

Число наблюдений (N)	Ошибка выборки (в %)	Границы 95%-ного доверительного интервала		Число наблюдений (N)	Ошибка выборки (в %)	Границы 95%-ного доверительного интервала	
		Нижняя	Верхняя			Нижняя	Верхняя
1	100	0	6	55	13	41	72
2	71	0	7	60	13	46	77
3	58	1	9	65	12	50	83
4	50	1	10	70	12	55	88
5	45	2	12	75	12	59	94
6	41	2	13	80	11	63	100
7	38	3	14	85	11	68	105
8	35	3	16	90	11	72	111
9	33	4	17	95	10	77	116
10	32	5	18	100	10	81	122
15	26	8	25	150	8	127	176
20	22	12	31	200	7	173	230
25	20	16	37	250	6	220	283
30	18	20	43	300	6	267	336
35	17	24	49	350	5	314	389
40	16	29	54	400	5	362	441
45	15	33	60	450	5	409	494
50	14	37	66	500	4	457	546

2.5.15.3 Ошибки при оценке процентных значений

Точность оценки процентных значений зависит не только от числа (N) подсчитанных сперматозоидов, но и от истинных, но неизвестных процентных значений (p) (биномиальное распределение). Приблизительная стандартная ошибка (CO) для процентных значений от 20 до 80 составляет $\sqrt{(p(100-p))/N}$. За пределами этого диапазона используют более подходящий метод тригонометрического преобразования (арксинус квадратного корня): $z = \sin^{-1}\sqrt{p/100}$ со стандартным отклонением $1/(2\sqrt{N})$ радиана, которое зависит только от числа подсчитанных сперматозоидов и не зависит от истинных процентных значений.

2.5.15.4 Сравнение процентных значений, полученных в разных препаратах

Если различия между процентными значениями, полученными в разных препаратах, превышают допустимые уровни, это свидетельствует об ошибках, допущенных при подсчете или пипетировании, или о неслучайном распределении клеток в камере или на предметном стекле из-за их ненадлежащего перемешивания. При таких пороговых значениях 95%-ного доверительного интервала примерно 5% препаратов окажутся за пределами диапазона только в силу случайности. В настоящее время точные границы доверительного интервала при биномиальном распределении могут быть сгенерированы компьютером, и они используются в данном руководстве в округленном виде для обеспечения того, чтобы предполагаемые вероятности (например, «менее 5%») были верными.

2.5.15.5 Важность подсчета достаточного числа сперматозоидов

Чтобы уменьшить влияние случайных вариаций, важно, чтобы оценки основывались на достаточном числе наблюдений (желательно, чтобы общее число наблюдений было не менее 400 на основе подсчета примерно по 200 сперматозоидов в каждом препарате) (**таблица 2.16 на стр. 87**). Точность оценки числа сперматозоидов зависит от числа подсчитанных сперматозоидов. При распределении Пуассона CO при подсчете числа сперматозоидов (N) равна его квадратному корню (\sqrt{N}), а 95%-ный доверительный интервал (ДИ) для числа сперматозоидов в объеме эякулята составляет приблизительно $N \pm 1,96 \times \sqrt{N}$ (или $N \pm$ приблизительно $2 \times \sqrt{N}$).

При подсчете 100 сперматозоидов CO составляет 10 ($\sqrt{100}$), а 95%-ный ДИ – 80–120 (100 ± 20 , или 20%). Если подсчитано 200 сперматозоидов, CO составляет 14 ($\sqrt{200}$), а 95%-ный ДИ – 172–228 (200 ± 28 , или 14%). Если подсчитано 400 сперматозоидов, CO составляет 20 ($\sqrt{400}$), а 95%-ный ДИ – 360–440 (400 ± 40 , или 10%).

Следует отметить, что при пороговом значении для идеальных форм, установленном на уровне 4%, для того, чтобы можно было бы утверждать, что 3% и 5% различаются, необходимо было бы оценить более 1500 сперматозоидов.

2.5.15.6 Статистическая теория, лежащая в основе сравнения

повторных подсчетов

Ожидается, что различие между числами, полученными в результате независимых подсчетов, будет равно нулю, а СО будет равна квадратному корню из суммы чисел, полученных в результате двух подсчетов. Таким образом, $(N1-N2)/(\sqrt{[N1+N2]})$ с 95%-ным ДИ должно быть менее 1,96 только в силу случайности.

Если различие между подсчитанными числами не превышает предельного значения, указанного для данной суммы в **таблице 2.3 на стр. 39**, оценки принимаются, и концентрация рассчитывается по их среднему значению (**таблица 2.4 на стр. 41**).

Более значительные различия свидетельствуют о том, что либо были допущены ошибки при подсчете или пипетировании, либо клетки были плохо перемешаны, что привело к их неслучайному распределению в камере или на предметном стекле.

Если различие между подсчитанными числами превышает допустимое значение, отбросьте два первых значения и приготовьте и оцените два свежих образца разведенного эякулята. (Не подсчитывайте число клеток в третьем образце и возьмите среднее из трех значений или среднее из двух ближайших значений.)

Это относится к подсчету сперматозоидов и пероксидаза-положительных клеток (**раздел 3.4.1.1 на стр. 122**). Для подсчета CD45-положительных клеток (**раздел 3.4.2 на стр. 127**) и незрелых половых клеток (**раздел 3.6 на стр. 133**) следует повторно оценить окрашенные препараты.

При данных пороговых значениях 95%-ного ДИ примерно 5% препаратов окажутся за пределами диапазона только в силу случайности.

2.5.16 Измерение сперматозоидов

Для различения головок сперматозоидов нормального и аномального размера может быть полезен окулярный микрометр.

Головки 77 окрашенных по Папаниколау сперматозоидов, классифицированных как нормальные по приведенным здесь критериям и измеренных с помощью компьютеризированной системы (коэффициент вариации для повторных измерений 2–7%), имели следующие размеры: средняя длина 4,1 мкм с 95%-ным ДИ 3,7–4,7 мкм; средняя ширина 2,8 мкм с 95%-ным ДИ 2,5–3,2 мкм; среднее отношение длины к ширине 1,5 с 95%-ным ДИ 1,3–1,8.

Средние части 74 окрашенных по Папаниколау сперматозоидов, классифицированных как нормальные по приведенным здесь критериям и измеренных с помощью той же компьютеризированной системы, имели следующие размеры: средняя длина 4,0 мкм с 95%-ным ДИ 3,3–5,2 мкм; средняя ширина 0,6 мкм с 95%-ным ДИ 0,5–0,7 мкм.

2.5.17 Примеры с решениями

2.5.17.1 Расчет концентрации других компонентов

Концентрация других клеток и, например, частей сперматозоидов (хвосты без головок, головки без хвостов) может быть рассчитана по отношению к концентрации сперматозоидов. При условии, что эти компоненты подсчитывались в том же объеме (поля МВР), что и сперматозоиды, можно использовать следующую формулу:

$$C = S \times N_i / N_s$$

где

C = концентрация других клеток, частей клеток или других компонентов, представляющих интерес;

S = рассчитанная концентрация сперматозоидов;

N_i = число подсчитанных других клеток, частей клеток или других компонентов;

N_s = число сперматозоидов, подсчитанных в том же объеме (на той же площади), что и данные компоненты.

2.5.17.2 Процентная доля сперматозоидов с нормальной морфологией и ИТЗ

Из 200 сперматозоидов, оцененных с помощью счетчика с 6 клавишами, 12 сперматозоидов оценены как нормальные, а 188 – как аномальные. Из 188 аномальных сперматозоидов 184 имеют дефекты головки, 102 – дефекты средней части, 30 – дефекты основной части и 44 – избыточную остаточную цитоплазму.

- нормальные формы: $12/200 = 6\%$
- аномальные головки: $184/200 = 91\%$
- аномальные шейки/средние части: $102/200 = 51\%$
- аномальные хвосты: $30/200 = 15\%$
- избыточная остаточная цитоплазма: $44/200 = 22\%$
- ИТЗ: $(184+102+30+44)/188 = 1,91$.

2.5.17.3 Подсчет частей сперматозоидов или клеток, не относящихся к сперматозоидам, в морфологических мазках

C = концентрация других клеток, частей клеток или других компонентов;

N = число клеток, не относящихся к сперматозоидам, или частей сперматозоидов, подсчитанное в том же числе полей, что и 200 сперматозоидов;



S = концентрация сперматозоидов в миллионах на мл;

C в миллионах на мл может быть рассчитана по формуле: $C = S \times (N/200)$.

2.5.17.4 Концентрация сперматозоидов

Пример 1

При разведении 1+1 (1 : 2) в препарате 1 содержится 200 сперматозоидов в 2 квадратах, а в препарате 2 – 250 сперматозоидов в 2 квадратах. Сумма значений (200+250) равна 450 в 4 квадратах, а разность (250–200) равна 50. Из **таблицы 2.3 на стр. 39** видно, что это превышает предельное различие (41), ожидаемое только в силу случайности, поэтому результаты отбрасываются, и делаются два новых разведенных препарата.

Пример 2

При разведении 1+1 (1 : 2) в препарате 1 содержится 219 сперматозоидов в 3 квадратах, а в препарате 2 – 180 сперматозоидов в 3 квадратах. Сумма значений (219+180) равна 399 в 6 квадратах, а разность (219–180) равна 39. Из **таблицы 2.3 на стр. 39** видно, что это равно предельному различию (39), то есть меньше ожидаемого только в силу случайности, поэтому значения принимаются.

Концентрация сперматозоидов в образце при разведении 1+1 (1 : 2) составляет $C = (N/n)/50$ сперматозоидов/нл = $(410/6)/50 = 1,37$ сперматозоида/нл, или $1,4 \times 10^6$ сперматозоидов/мл эякулята (с точностью до двух значащих цифр).

Пример 3

При разведении 1+1 (1 : 2) в препарате 1 содержится 120 сперматозоидов во всех 9 квадратах, а в препарате 2 – 140 сперматозоидов во всех 9 квадратах. Сумма значений (120+140) равна 260 в 18 квадратах, а разность (140–120) равна 20. Из **таблицы 2.3 на стр. 39** видно, что это меньше предельного различия (31), поэтому значения принимаются.

Когда в каждой камере оцениваются все девять квадратов (всего 1,8 мкл), концентрация сперматозоидов в образце при разведении 1+1 (1 : 2) будет следующей: $C = (N/1,8) \times 2$ сперматозоидов на мкл = $(260/1,8) \times 2 = 288,8$ сперматозоида/мкл, или 290×10^3 сперматозоидов на мл эякулята (с точностью до двух значащих цифр). Поскольку было подсчитано менее 400 сперматозоидов, укажите ошибку выборки для 260 сперматозоидов, как указано в таблице 2.3 (приблизительно 6,3%).

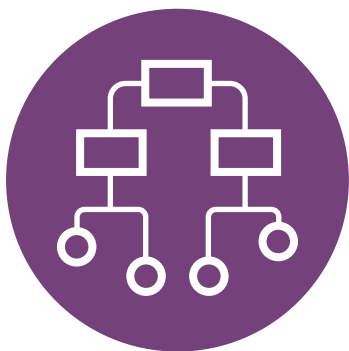
Пример 4

При разведении 1+1 (1 : 2) было обнаружено, что в препарате 1 содержится 10 сперматозоидов во всех 9 квадратах, а в препарате 2 – 8 сперматозоидов во всех 9 квадратах. Поскольку во всех 9 квадратах обнаружено менее 25 сперматозоидов, концентрация составляет менее 56 000/мл; укажите, что «в образцах было обнаружено 18 сперматозоидов, что слишком мало для точного определения концентрации (менее 56 000/мл)».

Пример 5

При разведении 1+1 (1 : 2) сперматозоиды не были обнаружены ни в одном препарате. Поскольку было подсчитано менее 25 сперматозоидов, концентрация составляет менее 56 000/мл; укажите, что «в препаратах сперматозоидов не обнаружено. Слишком мало клеток для точного определения концентрации (менее 56 000/мл)».





Глава 3. Расширенное исследование

3.1	Индексы множественных дефектов сперматозоидов	94
3.2	Фрагментация ДНК сперматозоидов.....	97
3.3	Генетические и геномные исследования.....	118
3.4	Исследования, связанные с иммунологией, и иммунологические методы	121
3.5	Оценка интерлейкинов – маркера воспаления мужских половых путей	131
3.6	Оценка незрелых половых клеток в эякуляте	133
3.7	Исследования для обнаружения сперматозоидов, покрытых антителами	134
3.8	Биохимические анализы функции добавочных половых желез	141
3.9	Оценка последовательности эякуляции	153

Тесты, описанные в этой главе, не являются необходимыми для обычного исследования эякулята, но в определенных обстоятельствах могут иметь практическое значение для диагностических или исследовательских целей. В некоторых публикациях может указываться, что в основе практической значимости того или иного теста лежит высокий коэффициент корреляции. Вместе с тем даже при высоких коэффициентах корреляции, для того чтобы оценить практическую значимость теста для конкретного мужчины, необходимо учитывать прогностическую ценность положительных и отрицательных результатов (вероятность того, что положительный или отрицательный результат является истинным).

Описание некоторых включенных в эту главу тестов дается с учетом рекомендованных стандартных тестов. В целях стандартизации и ясности рекомендаций альтернативные тесты были перенесены в эту главу. Лаборатории могут рассмотреть вопрос об использовании таких тестов вместо рекомендованных базовых исследований при условии установления и разъяснения связи с базовыми исследованиями.

“

В клинической практике растет понимание того, что в основе широкого спектра причин мужского бесплодия лежат хромосомные аномалии и генные мутации, наблюдаемые при исследовании эякулята.

”



3.1 Индексы множественных дефектов сперматозоидов

Морфологически аномальные сперматозоиды часто имеют множественные дефекты (дефекты головки, средней части или основной части или комбинации этих дефектов). Детальная оценка частоты встречаемости морфологических аномалий может быть более важной, чем простая оценка процентной доли морфологически нормальных сперматозоидов, особенно в исследованиях степени нарушения сперматогенеза человека (58, 153). Регистрация морфологически нормальных сперматозоидов, а также сперматозоидов с аномалиями головки, средней части и основной части в системе многократного ввода позволяет получить среднее число аномалий на один оцениваемый сперматозоид.

На основе детальной регистрации аномалий головки, средней части и основной части в системе многократного ввода могут быть получены три индекса:

- индекс тератозооспермии (ИТЗ) (104, 154) (как рекомендовано в главе 2);
- индекс множественных аномалий (ИМА) (58); и
- индекс деформированности сперматозоидов (ИДС) (155–157).

Эти индексы коррелируют с фертильностью *in vivo* (ИМА и ИТЗ) (58, 104) и *in vitro* (ИДС) (155) и могут быть полезны при оценке определенных повреждающих воздействий или патологических состояний (153, 156, 157).

3.1.1 Расчет индексов множественных морфологических дефектов

Каждый аномальный сперматозоид оценивается на предмет наличия дефектов головки, средней части и основной части, а также избыточной остаточной цитоплазмы (объем, превышающий одну треть размера головки сперматозоида). Можно использовать лабораторные счетчики клеток с клавишами для ввода, число которых зависит от типа рассчитываемого индекса. При отсутствии счетчика можно использовать простой оценочный лист.

- При расчете ИТЗ на один аномальный сперматозоид приходится максимум четыре дефекта: по одному на головку, среднюю часть и основную часть и один на избыточную остаточную цитоплазму. Можно использовать морфологические критерии, приведенные в данном руководстве (см. также раздел **Микроскопическая оценка и расчет результатов на стр. 62**).
- ИМА схож с ИТЗ, поскольку в его основе лежит среднее число аномалий на один аномальный сперматозоид. При расчетах учитываются все аномалии головки, средней части и основной части. Морфологические критерии, используемые для этого исследования, взяты из документа (158) с учетом модификаций, изложенных в документе (159), и отличаются от представленных в данном руководстве (**раздел 2.4.9 на стр. 48**).
- ИДС – это число дефектов, разделенное на общее число сперматозоидов (не только аномальных сперматозоидов). При его расчете учитываются несколько категорий аномалий головки, но только по одному дефекту средней и основной части. Можно использовать морфологические критерии, приведенные в данном руководстве.

В таблице 3.1 приведен пример расчета этих индексов для демонстрации различий между ними.

Таблица 3.1 Расчет индексов множественных дефектов сперматозоидов

	ИМА	ИТЗ	ИДС
Максимальное значение		4,00	3,00
Знаменатель	число аномальных сперматозоидов	число аномальных сперматозоидов	число всех сперматозоидов
(А) Число подсчитанных сперматозоидов	200	200	200
нормальные сперматозоиды (число)	46	46	46
нормальные сперматозоиды (%)	23	23	23
(В) Число сперматозоидов с дефектами (200–46)	154	154	154
(1) Число дефектов головки (ИМА, ИДС) или число сперматозоидов более чем с одним дефектом головки (ИТЗ)	284	154	212
(2) Число дефектов средней части (ИМА) или число сперматозоидов не менее чем с одним дефектом средней части (ИТЗ, ИДС)	54	52	52
(3) Число дефектов основной части (ИМА) или число сперматозоидов не менее чем с одним дефектом основной части (ИТЗ, ИДС)	54	46	46
(4) Число сперматозоидов с избыточной остаточной цитоплазмой	14	14	14
(С) Общее число дефектов (1)+(2)+(3) (= С) (ИМА)	392		
(D) Общее число дефектов (1)+(2)+(3)+(4) (= D) (ИТЗ, ИДС)		266	324
Расчет индекса	С/В	D/В	D/А
Значение индекса	2,55	1,72	1,62



Примечание. Данное описание расчета ИТЗ соответствует описанию, приведенному в оригинальном документе (Менквелд и др.) (104) и руководстве Европейского общества репродукции человека и эмбриологии (12) и Скандинавской ассоциации андрологов (160), в которых приводятся значения в диапазоне от 1,00 до 4,00. Это отличается от описания, приведенного в предыдущем издании данного руководства (4), в котором избыточная остаточная цитоплазма не регистрировалась отдельно, а значения ИТЗ давались в диапазоне от 1,00 до 3,00.

3.1.2 Интерпретация

В таблице 3.2 представлены значения ИМА и ИТЗ для мужчин, посещающих клиники по лечению бесплодия, и мужчин, ставших отцами в течение последних трех лет. Следует отметить, что между фертильными мужчинами и мужчинами в субфертильных парах наблюдается перекрытие показателей, и это означает, что и в отношении этих показателей не существует четкого разграничения между фертильными в полной мере и субфертильными мужчинами.

Вместе с тем следует помнить, что прогноз спонтанного или искусственного оплодотворения не является единственным предназначением морфологической оценки сперматозоидов человека. Нарушение сперматогенеза у мужчин с обычной с точки зрения количества выработкой спермы дает дополнительную информацию и может указывать на тестикулярный стресс, дисфункцию придатка яичка или даже на генетические дефекты хвостов сперматозоидов. В последнем случае любая гормональная стимуляция вряд ли будет успешной, и паре может быть предложено клиническое генетическое исследование, с тем чтобы понять риск появления таких дефектов у потомства.

Отмеченные различия в индексах дефектов сперматозоидов у мужчин в фертильных и бесплодных парах невелики, что затрудняет использование этих критериев для разграничения этих групп с помощью данных индексов. В соответствии с несколько иной системой классификации множественные морфологические аномалии жгутиков (ММАЖ) (161), рассмотренные Куттоном и др. (162), и морфогенетические нарушения связаны с рядом генетических дефектов, влияющих на функцию сперматозоидов.

Таблица 3.2 Индексы дефектов сперматозоидов для мужчин в фертильных и бесплодных парах

	Бесплодные пары		Фертильные пары	
	ИМА ^a	ИТЗ ^b	ИМА ^c	ИТЗ ^b
Среднее значение	1,94	1,81	1,58	1,51
Стандартное отклонение	0,37	0,30	0,20	0,20
Минимум	1,12	1,26	1,04	1,17
Максимум	3,9	2,64	2,38	2,07
Процентили				
5	1,44		1,27	
10	1,51	1,74	1,34	1,33
25	1,67		1,44	
50	1,88	1,81	1,58	1,54
75	2,14		1,72	
90	2,44		1,86	
95	2,65		1,94	
Число	4 930	103	994	107

^a Неопубликованные данные Ж. Ожера, Париж, с использованием морфологической классификации Дэвида (158) с модификацией Ожера и Юсташа (2000 г.) (159).

^b Менквелд и др. (2001 г.) (104).

^c Йоргенсен и др. (2001 г.) (163) с использованием морфологической классификации Дэвида (158) с модификацией Ожера и Юсташа (2000 г.) (159).

3.2 Фрагментация ДНК сперматозоидов

3.2.1 Справочная информация

Повреждение ДНК сперматозоидов можно определить как любое химическое изменение нормальной структуры ДНК. Среди этих изменений фрагментация ДНК сперматозоидов (ФДС) является одной из наиболее распространенных патологий, влияющих на генетический материал в виде одно- или двуниевых разрывов. ФДС может быть вызвана различными процессами, включая дефектную упаковку ДНК во время сперматогенеза и процессы гибели клеток и оксидативного стресса, которые могут быть связаны с некоторыми патологическими и экологическими условиями (164–166).

Несмотря на то, что при наличии ФДС способность сперматозоидов к оплодотворению может и не нарушаться, многочисленные метаанализы, опубликованные в последние годы, показывают, что ФДС может влиять на развитие эмбриона, имплантацию и беременность как при естественном, так и при искусственном оплодотворении (167–170). Кроме того, известно, что ФДС распространена среди мужчин с аномальными параметрами эякулята, и было предложено связать ее со случаями бесплодия у людей с нормозооспермией. Поскольку ФДС лишь отчасти связана с качеством сперматозоидов (164, 171), оценка этого широкого обсуждаемого и перспективного биомаркера в фундаментальной и клинической андрологии может стать важным дополнительным компонентом в клиническом исследовании мужского бесплодия.

Было разработано несколько методов исследования ФДС, основанных на проникновении в хроматин сперматозоида для оценки наличия фрагментации ДНК (т.е. однонитевых или двуниевых разрывов ДНК). Представленные здесь методы широко используются в течение последних 20 лет в андрологических лабораториях и лабораториях вспомогательной репродукции.

Исследования, которые могут быть использованы для оценки ФДС, значительно различаются как по методу, так и по типу повреждения, которое они выявляют. TUNEL-тест (введение концевой метки с использованием терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TDT)) и Comet-тест (анализ единичной клетки методом гель-электрофореза) непосредственно оценивают наличие однонитевых и/или двуниевых разрывов в ДНК, в то время как проточная цитометрия с акридиновым оранжевым (AO FCM) и тест дисперсии хроматина сперматозоидов (SCD) определяют восприимчивость хроматина к обработке кислотой.

Диагностические пороги (называемые также пороговыми значениями) этих методов специфичны для каждого теста и метода, с помощью которого данный тест выполняется. Для клинического использования соответствующие пороговые значения должны быть определены и подтверждены лабораторией, выполняющей анализ. Для определения практической значимости того или иного теста для конкретного пациента важно, чтобы изучались не только корреляции в совокупности; для оценки и подтверждения целесообразности проведения теста в реальной клинической практике необходимы данные о прогностической ценности положительных и отрицательных результатов.

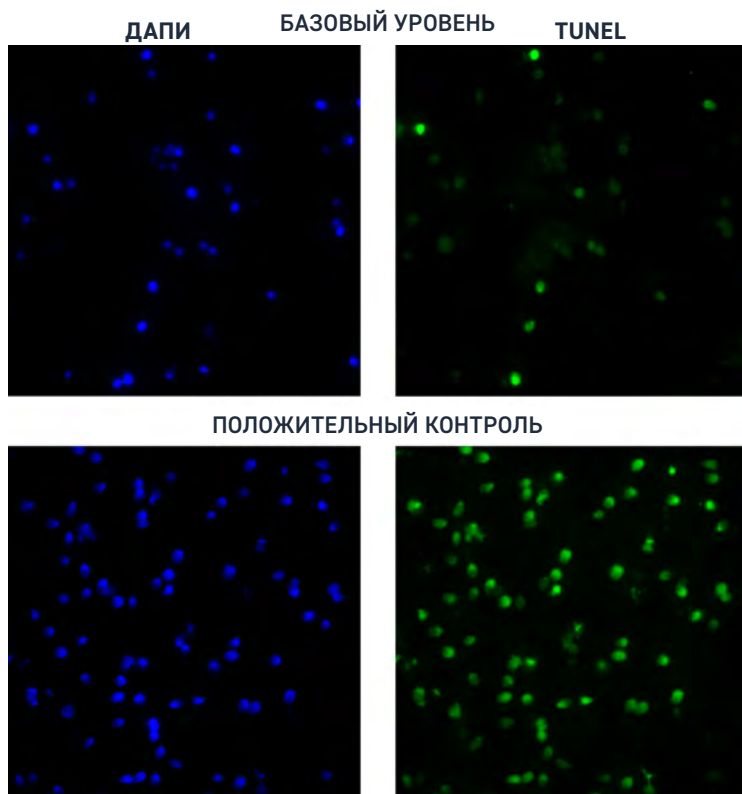
3.2.2 TUNEL-тест

TUNEL-тест является еще одним из наиболее распространенных методов оценки фрагментации ДНК сперматозоидов. Это исследование основано на обнаружении разрывов нитей ДНК *in situ* путем их мечения флюорохромами или зондами с биотиновой меткой, которые используются со стрептавидином-HRP (пероксидазой хрена) и хромогенным субстратом HRP. Принцип TUNEL-теста заключается в мечении разрывов, имеющихся в ДНК, дезоксинуклеотидами (обычно дезоксиуридинтрифосфатом (дУТФ)). дУТФ может быть непосредственно конъюгирован с флуоресцентным красителем или помечен биотином.

3'-ОН-концы разрывов нитей ДНК служат праймерами и в ходе этой процедуры помечаются бромдезоксиуридином (БДУ) в процессе реакции, катализируемой независимой от шаблона ДНК-полимеразой, называемой терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой (TDT) (172). С помощью этого метода можно непосредственно оценивать как однонитевые, так и двунитевые разрывы, поскольку чем больше участков разрыва нити ДНК, тем больше меток встраивается в клетку. дУТФ – это субстрат, который добавляется ферментом TDT к свободным 3'-ОН-концам. Добавленный дУТФ может быть непосредственно меченым и, следовательно, действовать как прямой маркер разрывов ДНК, или же сигнал может быть усилен за счет использования модифицированного дУТФ, на который можно адсорбировать меченое антитело анти-дУТФ (можно использовать не только дУТФ, но и другие дезоксинуклеотиды) (173).

Рис. 3.1 Предметные стекла TUNEL-теста для обнаружения фрагментации ДНК с использованием флуоресценции

На верхних панелях показаны окрашенные ДАПИ сперматозоиды (синий) и флуоресцентно окрашенные сперматозоиды с повреждениями ДНК (зеленый), демонстрирующие базовый уровень повреждений; на нижних панелях представлен положительный контроль, где практически все показанные сперматозоиды (синий) демонстрируют фрагментацию ДНК на основе их зеленой флуоресценции.



Фотографии любезно предоставили д-р К. Роман-Монтанана и д-р Дж. Киркман-Браун.

Существует несколько коммерческих наборов, в которые входят меченые зонды и фермент TDT, необходимый для связывания зонда с разрывами ДНК. После мечения процентное значение флуоресцирующих сперматозоидов может быть определено с помощью флуоресцентного микроскопа или проточного цитометра. В случае использования зондов с биотиновой меткой для выявления меченых сперматозоидов необходимы стрептавидин-HRP (пероксидаза хрена) и хромогенный субстрат HRP. Клетки, окрашенные этим методом, можно визуализировать с помощью микроскопа для их оценки (рис. 3.1); вместе с тем для высокопроизводительной оценки клинических образцов эякулята TUNEL-тест можно использовать в сочетании с проточной цитометрией, что позволяет количественно оценить долю генетически поврежденных клеток в образце эякулята.

При использовании микроскопа следует оценивать не менее 200 сперматозоидов. Сообщалось, что какие-либо изменения на различных этапах проведения TUNEL-теста могут значительно влиять на полученные показатели (174). Поэтому важно, чтобы каждая лаборатория стандартизировала методику и установила свои собственные пороговые значения.

3.2.2.1 Основной метод

Реагенты

- Human tubal fluid (жидкость маточной трубы человека) или Biggers, Whitten and Whittingham (состав HTF и BWW см. в **приложении на стр. 265**);
- Фосфатно-солевой буферный раствор Дюльбекко (состав DPBS см. в **приложении на стр. 266**);
- DPBS, содержащий 1%-ный альбумин бычий сывороточный (BSA);
- DPBS, содержащий 0,1%-ный цитрат и 0,1%-ный тритон;
- 3,7%-ный параформальдегид, приготавливаемый в DPBS еженедельно;
- 3000 Ед/мл – 3 Ед/мл микрококковой нуклеазы или рекомбинантной дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) I в 50 мм Трис-HCL, pH 7,5, 1 мг/мл BSA.

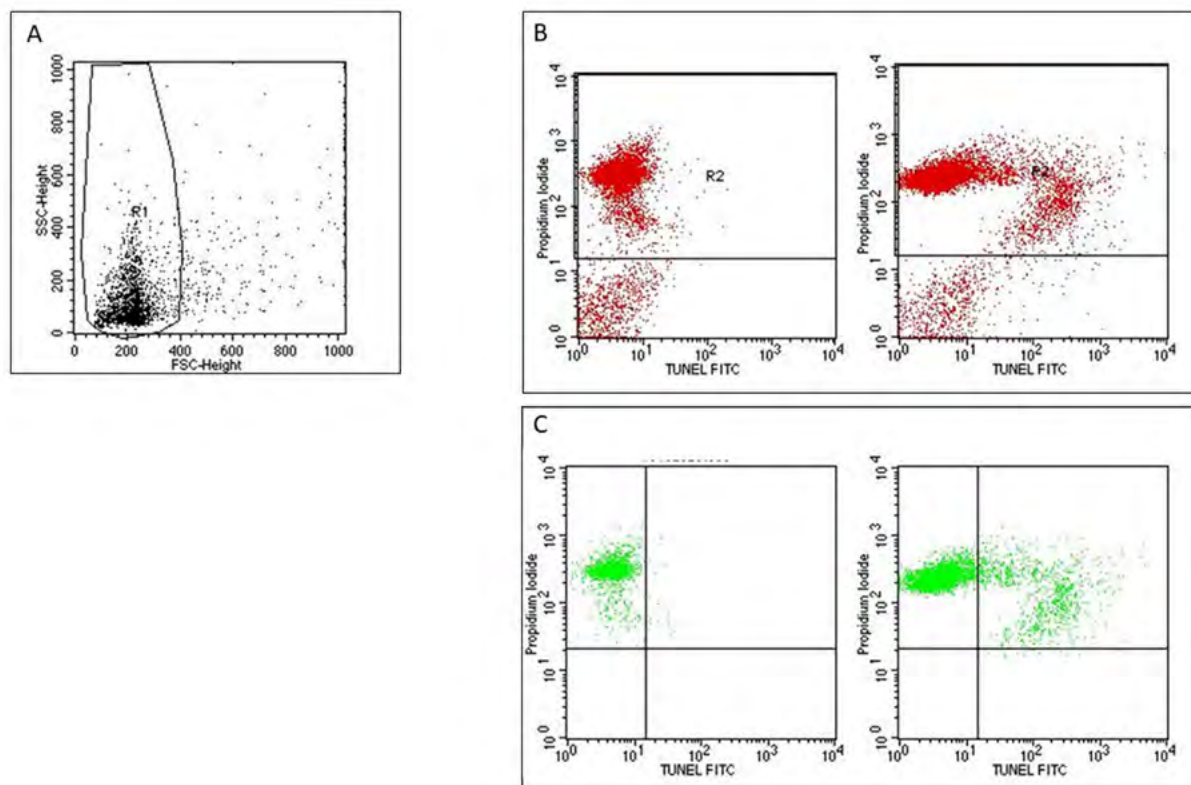
Процедура

1. Аликвота эякулята, содержащая не менее 2 миллионов (для образцов с малым числом сперматозоидов), но предпочтительно 10 миллионов сперматозоидов, дважды отмывается буферным раствором (HTF или BWW, состав см. в приложении; для образцов, содержащих менее 2 миллионов сперматозоидов, вместо этого можно использовать флуоресцентную микроскопию и оценить процентную долю TUNEL-положительных сперматозоидов) путем центрифугирования при 500g в течение 5 минут. Для образцов с числом сперматозоидов менее 2 миллионов после процедуры окрашивания TUNEL-положительные сперматозоиды могут быть оценены, как указано в разделе **TUNEL-тест в сочетании с флуоресцентной микроскопией на стр. 98**.
2. Ресуспандируйте осадок в 500 мкл параформальдегида (3,7%-ный свежий, приготавливаемый в DPBS еженедельно) для фиксации при комнатной температуре в течение 30 минут.

3. Центрифугируйте при 500g в течение 5 минут и дважды отмойте осадок в 200 мкл DPBS, содержащего 1%-ный BSA, как указано выше.
4. Для пермеабиллизации сперматозоидов добавьте 100 мкл буферного раствора, содержащего цитрат (0,1%) и тритон (0,1%), и инкубируйте на льду в течение 4 минут.
5. Чтобы остановить пермеабиллизацию, добавьте 300 мкл DPBS, содержащего 1%-ный BSA, и центрифугируйте при 500g в течение 5 минут.
6. Слейте супернатант и ресуспендируйте осадок в 400 мкл DPBS, содержащего 1%-ный BSA, и разделите на две аликвоты – отрицательный контроль (TDT-) и тестовый образец (TDT+) соответственно.
7. Для демонстрации того, что процедура позволяет распознать фрагментированную ДНК, может быть полезен положительный контроль. В этом случае следует приготовить еще одну аликвоту сперматозоидов, как указано выше, и после пермеабиллизации инкубировать с микрококковой нуклеазой или рекомбинантной ДНКазой I (3000 Ед/мл – 3 Ед/мл в 50 мм Трис-НСl, рН 7,5, 1 мг/мл BSA) в течение 10 минут при 15–25°C, чтобы вызвать разрывы нитей ДНК перед процедурами мечения.
8. Центрифугируйте три аликвоты (при 500g в течение 5 минут) и ресуспендируйте следующим образом: TDT-: добавьте только буферный раствор, содержащий меченый зонд; TDT+ и положительный контроль: добавьте буферный раствор, содержащий меченый зонд и TDT (30 единиц или иное количество в соответствии с указаниями, приводимыми в различных коммерческих наборах).
9. Инкубируйте (в случае флуоресцентных зондов в темноте) в течение 1 часа при 37°C.
10. Отмойте дважды в 200 мкл DPBS, содержащего 1%-ный BSA, и ресуспендируйте в DPBS. Конечный объем DPBS варьируется в зависимости от метода, используемого для выявления меченого зонда. При использовании микроскопа следует использовать небольшой объем (максимум 100 мкл) для установки предметных стекол с достаточным числом сперматозоидов для исследования под флуоресцентным или световым микроскопом. Следует оценивать не менее 200 сперматозоидов.
11. В случае использования проточного цитометра образцы должны быть дважды отмыты, ресуспендированы в 500 мкл DPBS, окрашены пропидием иодидом (PI, 30 мкг/мл в DPBS) или другим красителем для окрашивания ядер, совместимым с флуоресценцией TUNEL-теста, и инкубирован в темноте в течение 10 минут при комнатной температуре для выявления событий нуклеации. Применительно к каждому образцу в области, содержащей сперматозоиды (пламевидная область (174), изображенная на точечной диаграмме прямого/бокового светорассеяния (FSC/SSC) (R1 на рис. 3.2A), должно быть зарегистрировано 8000–10 000 PI-положительных событий за исключением других клеток (таких как клетки сперматогенеза, лейкоциты, которые находятся за пределами пламени) и мешающих компонентов, присутствующих в эякуляте (включая PI-отрицательные события, такие как апоптотические тельца, которые могут присутствовать в R1). Зеленая флуоресценция (нуклеотидов, конъюгированных с флуоресцеином) и красная флуоресценция (PI события) выявляются детекторами волн в диапазоне 515–555 нм и 563–607 нм соответственно.

Затем строится область R2, включающая все PI-положительные события в пределах области R1 (рис. 3.2B, левая и правая панели). В отрицательном контроле устанавливается порог флуоресценции фрагментации ДНК (TUNEL-положительные сперматозоиды), включающий 99% PI-положительных событий (рис. 3.2C, левая панель). Затем этот порог копируется в тестовом образце (рис. 3.2C, правая панель) для расчета процентной доли событий, положительных на PI и зеленую флуоресценцию, за пределами порога, что представляет собой процентную долю сперматозоидов с фрагментацией ДНК.

Рис. 3.2 Проточная цитометрия для исследования сперматозоидов с использованием пропидия иодида и зеленой флуоресценции



Любезно предоставлено Элизабеттой Балди.

Панель А: типичная пламевидная область на точечной диаграмме FSC/SSC, содержащая сперматозоиды и апоптотические тельца (R1). **Панель В:** гейт, очерченный вокруг PI-положительных событий (R2), исключая апоптотические тельца. **Панель С,** слева: отрицательный контроль, где установлен маркер, включающий 99% отрицательных событий. Панель С, справа: тестовый образец, в котором скопированы маркеры, установленные в отрицательном контроле. Процентная доля сперматозоидов с фрагментацией ДНК находится в правом верхнем квадранте.

3.2.2.2 Альтернативная TUNEL-процедура

Адаптировано из документов Дарзинкевича и др. (176) и Шармы и др. (173).

Реагенты

- Фосфатно-солевой буферный раствор (**DPBS**), pH 7,4;
- 1–3,7%-ный (v/v) формальдегид в DPBS;
- 70%-ный этанол, pH 7,4;
- Рабочий буферный раствор TDT 5X: 1 М какодилата калия (или натрия), 125 мМ HCl, pH 6,6, 1,25 мг/мл BSA;
- Исходный раствор Br-dUTP: 2 мМ Br-dUTP в 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5;
- 12,5 единиц TDT, поставляемого в буфере для хранения: 60 мМ фосфата калия при pH 7,2, 150 мМ KCl, 1 мМ 2-меркаптоэтанола и 0,5%-ного Тритона X-100, 50%-ный глицерин;
- 10 мМ CoCl₂;
- Дистиллированная H₂O;
- 0,1%-ный Тритон X-100 и 5 мг/мл BSA, растворенного в DPBS;
- Раствор флуоресцеинизотиоцианата (FITC)-(или Alexa Fluor 488)-конъюгированного anti-Br-dU mAb: 0,1–0,3 мкг флуорохром-конъюгированного anti-Br-dU Ab в 100 мкл DPBS, содержащего 0,3%-ный Тритон X-100 и 1%-ный (w/v) BSA;
- Раствор PI для окрашивания: 5 мкг/мл PI, 100 мкг/мл РНКазы А (свободной от ДНКаз) в DPBS.

Протокол

1. Суспендируйте 1–5×10⁶ сперматозоидов в 0,5 мл DPBS, pH 7,4.
2. Перенесите эту суспензию с помощью пипетки Пастера в полипропиленовую пробирку объемом 5 мл, содержащую 4,5 мл ледяного 1–3,7%-ного (v/v) формальдегида в DPBS, pH 7,4. Держите пробирку на льду в течение 30–60 минут.
3. Центрифугируйте при 300g в течение 5 минут и ресуспендируйте осадок сперматозоидов в 5 мл DPBS.
4. Снова центрифугируйте при 300g в течение 5 минут и ресуспендируйте осадок сперматозоидов в 0,5 мл DPBS.
5. Перенесите суспензию в пробирку, содержащую 4,5 мл ледяного 70%-ного этанола, pH 7,4, и снова выполните этот шаг с помощью пипетки Пастера. Если это необходимо или удобно, суспензию сперматозоидов можно хранить в этаноле в течение нескольких недель при температуре –20°C.
6. Центрифугируйте при 200g в течение 3 минут для удаления этанола и ресуспендируйте сперматозоиды в 5 мл DPBS.



7. Снова центрифугируйте при 300g в течение 5 минут и ресуспендируйте осадок в 50 мкл раствора, содержащего:

- 10 мкл рабочего буферного раствора TDT 5X: 1 М какодилата калия (или натрия), 125 мМ HCl, pH 6,6, 1,25 мг/мл BSA;
- 2,0 мкл исходного раствора Br-dUTP: 2 мМ Br-dUTP в 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5;
- 0,5 мкл (12,5 единиц) TDT, поставляемого в буфере для хранения: 60 мМ фосфата калия при pH 7,2, 150 мМ KCl, 1 мМ 2-меркаптоэтанола и 0,5%-ного Тритона X-100, 50%-ный глицерин;
- 5 мкл 10 мМ CoCl₂;
- 33,5 мкл дистиллированной H₂O.

8. Инкубируйте клетки в этом растворе в течение 40 минут при 37°C.

9. По истечении времени инкубации добавьте 1,5 мл отмывочного буферного раствора: 0,1%-ный Тритон X-100 и 5 мг/мл BSA, растворенного в DPBS, и центрифугируйте при 300g в течение 5 минут.

10. Ресуспендируйте клеточный осадок в 100 мкл раствора FITC-(или Alexa Fluor 488)-конъюгированного anti-Br-dU mAb: 0,1–0,3 мкг флуорохром-конъюгированного anti-Br-dU Ab в 100 мкл DPBS, содержащего 0,3%-ный Тритон X-100 и 1%-ный (w/v) BSA.

11. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 1 часа.

12. Добавьте 1 мл раствора PI для окрашивания: 5 мкг/мл PI, 100 мкг/мл RNase A (DNase-free) (Sigma) в DPBS.

13. Инкубируйте в темноте в течение 30 минут при комнатной температуре или 20 минут при 37 °C.

3.2.2.3 Результаты

TUNEL-тест в сочетании с проточной цитометрией

Исследуйте клетки методом проточной цитометрии с помощью синего лазера с длиной волны 488 нм. Измерьте зеленую флуоресценцию FITC-(или Alexa Fluor 488)-anti-Br-dU Ab при 530/20 нм. Измерьте красную флуоресценцию PI при более 600 нм.

TUNEL-тест в сочетании с флуоресцентной микроскопией

1. Загрузите аликвоту окрашенного образца на предметное стекло и накройте покровным стеклом.
2. Оцените не менее 500 сперматозоидов в образце под объективом 40× эпифлуоресцентного микроскопа (длина волн возбуждающего излучения между 460 и 490 нм и эмиссионного излучения более 515 нм).
3. Сначала подсчитайте число окрашенных PI (красный цвет) сперматозоидов в каком-либо поле.



4. Подсчитайте число клеток, излучающих зеленую флуоресценцию (TUNEL-положительных), в этом же поле.
5. Рассчитайте процентную долю TUNEL-положительных клеток.

3.2.2.4 Клиническая интерпретация

TUNEL-тест может быть проведен несколькими способами. В зависимости от используемого протокола разные лаборатории сообщают о различных пределах, которые используются для различения здоровых образцов эякулята и образцов, коррелирующих с мужским бесплодием (164, 173, 177–179). Поэтому каждая лаборатория должна установить свой собственный референсный диапазон с использованием соответствующих механизмов контроля, основываясь на прогностической ценности положительных и отрицательных результатов, и четко определить, к чему относится прогностическое значение (например, зачатие, выкидыш или другие события).

3.2.2.5 Технические примечания

- Одним из важных шагов для успешного проведения исследования является префиксация перекрестносшивающим агентом, таким как формальдегид, которая позволяет предотвратить экстракцию значительно фрагментированной ДНК во время многократных отмываний в ходе процедуры. Для каждого цикла исследований необходимо использовать свежеприготовленный формальдегид.
- Учитывая высокую степень конденсации хроматина сперматозоидов, некоторые авторы предлагают включить этап деконденсации хроматина в протокол TUNEL-теста для повышения его чувствительности. В рамках такой процедуры перед этапом 5 образцы ресуспендируют в растворе для деконденсации (1,4-дителиотрейтол (DTT) 5 мМ; гепарин 100 Ед/мл и 0,1%-ный Тритон X-100 в **DPBS**) и инкубируют в темноте при комнатной температуре (25°C) в течение 30 минут. Более подробную информацию об этой процедуре см. в документе Антонуччи и др. (180).
- Для обеспечения согласованности результатов и исключения потери активности TDT, деградации бром-дезоксидеоксирибонуклеотидтрифосфата (BrdUTP) и других методологических проблем в случае отрицательных результатов крайне важно включать в каждый цикл исследований положительный и отрицательный контроль. Для положительного контроля сперматозоидов повреждение ДНК может быть вызвано расщеплением под воздействием DNase I в процессе инкубации образца, собранного здоровым донором, со 100 мкл DNase I (1 мг/мл) в течение 1 часа при 37°C. Для отрицательного контроля сперматозоиды можно инкубировать в том же растворе, который используется на этапе 7, но без TDT. Храните фиксированные аликваты этих контрольных тестов, в которых ранее было определено процентное значение фрагментации ДНК, чтобы обрабатывать их вместе с будущими сериями исследуемых образцов.
- Многократные этапы центрифугирования могут привести к случайной потере клеток; чтобы свести ее к минимуму, рекомендуется использовать пробирки из полипропилена или силиконизированного стекла.

- Избегайте электростатического прикрепления клеток к поверхности пробирок, выполняя все этапы процедуры (включая фиксацию) в одной и той же пробирке. Добавление 1%-ного или 2%-ного BSA в отмывочные растворы также способствует уменьшению потери клеток.
- Избегайте потери клеток из-за повреждения осадка в результате ненужного центрифугирования, оставляя 50–100 мкл супернатанта при аспирации.
- Инкубация должна проводиться во влажной атмосфере во избежание артефактов высыхания.
- Если используется прямое мечение, в рабочий раствор включается флуорохром-конъюгированный дезоксинуклеотид (0,25–0,5 нмоль на 50 мкл). В этом случае после инкубации (этап 8) окрасьте сперматозоиды непосредственно раствором PI (этап 12) и проведите исследование методом проточной цитометрии, используя соответствующую длину волн возбуждающего и эмиссионного излучения для используемого флуорохрома.
- Из-за короткого времени активности окрашивающего раствора (~24 часа при 4°C) готовьте его незадолго до проведения исследования и только в необходимом количестве.
- Клетки необходимо исследовать как можно быстрее. Длительная задержка (более 1 часа) приведет к чрезмерному окрашиванию и деградации клеток.
- Разработаны также модифицированные методы TUNEL-теста, включающие оценку жизнеспособности сперматозоидов (181–183).

3.2.3 Исследование дисперсии хроматина сперматозоидов

3.2.3.1 Справочная информация

Исследование дисперсии хроматина сперматозоидов (SCD-тест) – это метод световой микроскопии для оценки подверженности ДНК сперматозоидов кислотной денатурации. SCD-тест основан на том, что после денатурации и экстракции ядерных белков целые петли ДНК расширяются, тогда как при фрагментации ДНК дисперсия не развивается или является минимальной. Этот метод основан на способности неповрежденного хроматина сперматозоидов образовывать ореолы рассеяния после воздействия кислоты и лизирующего раствора; ореолы соответствуют расслабленным петлям ДНК, прикрепленным к остаточной ядерной структуре, которые высвобождаются после экстракции ядерных белков. Разрывы ДНК, поскольку они подвержены денатурации, препятствуют такой дисперсии. Этот метод состоит из трех основных этапов: (1) встраивание сперматозоидов в матрицу агарозы, которая обеспечивает инертный субстрат, подобный суспензии, для манипулирования клетками; (2) инкубация в кислотном растворе для разматывания ДНК с последующим лизисом; кислотный раствор действует как денатуратор ДНК, который растворяет двойную спираль ДНК только при наличии повреждения ДНК, а лизирующий раствор используется для экстракции ядерных белков; и (3) отмывание, дегидратация в ванночках с возрастающим содержанием этанола и окрашивание для визуализации под световым микроскопом (184, 185).

SCD-тест доступен также в виде коммерческих наборов, которые содержат все реагенты для исследования, что обеспечивает простоту его применения и технического осуществления, а также получение воспроизводимых и последовательных результатов в различных клинических лабораториях.

3.2.3.2 Основной метод

Адаптировано из документа Фернандеса и др. (185, 186).

Реагенты

- 1%-ная водная агароза с низкой температурой плавления;
- 0,65%-ная стандартная агароза;
- **DPBS**;
- 0,08 N HCl;
- Нейтрализующий и лизирующий раствор (0,4 M Трис, 0,8 M DTT, 1%-ный SDS и 50 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), pH 7,5);
- Второй нейтрализующий и лизирующий раствор (0,4 M Трис, 2 M NaCl и 1%-ный SDS, pH 7,5);
- Буферный раствор трис-борат-ЭДТА (0,09 M трис-бората и 0,002 M ЭДТА, pH 7,5);
- 70%-ный, 90%-ный и 100%-ный этанол;
- Раствор Райта с **DPBS** (1 : 1).

Процедура

1. Доведите концентрацию необработанных образцов эякулята до 5–10×10⁶ сперматозоидов/мл с помощью DPBS. Предпочтительны свежие образцы, но можно использовать образцы, непосредственно замороженные в жидком азоте. Исследование должно быть валидировано для свежих и замороженных образцов эякулята.
2. Смешайте суспензии сперматозоидов с 1%-ной водной агарозой с низкой точкой плавления (для получения конечной концентрации агарозы 0,7%) при 37°C.
3. Пипетируйте 50 мкл смесей на стеклянные предметные стекла, предварительно покрытые 0,65%-ной стандартной агарозой, высушенной при 80°C.
4. Накройте препараты покровными стеклами (24 мм × 60 мм), избегая попадания пузырьков воздуха.
5. Поместите предметное стекло горизонтально на холодную поверхность, например, на металлическую или стеклянную пластину, предварительно охлажденную при 4°C.

6. Поместите холодную пластину с предметным стеклом в холодильник при 4°C на 5 минут, чтобы агароза затвердела.
7. Снимите покрывное стекло, аккуратно сдвинув его.
8. Незамедлительно погрузите предметные стекла в горизонтальном положении в лоток со свежим раствором кислотной денатурации (0,08 N HCl) на 7 минут при 22°C в темноте.
9. Перенесите предметные стекла в лоток с нейтрализующим и лизирующим раствором (0,4 M Трис, 0,8 M LNN, 1%-ный SDS и 50 mM ЭДТА, pH 7,5) на 10 минут при комнатной температуре.
10. Инкубируйте предметные стекла во втором нейтрализующем и лизирующем растворе (0,4 M Трис, 2 M NaCl и 1%-ный SDS, pH 7,5) в течение 5 минут при комнатной температуре.
11. Тщательно отмойте предметные стекла в буферном растворе трис-борат-ЭДТА (0,09 M трис-бората и 0,002 M ЭДТА, pH 7,5) в течение 2 минут.
12. Дегидратируйте клетки, используя последовательные ванночки с этанолом при концентрации 70%, 90% и 100%, по 2 минуты в каждой.
13. Оставьте предметное стекло сушиться в горизонтальном положении при комнатной температуре или в сушильном шкафу при 37°C.
14. Покройте высушенный микрогель слоем свежего раствора красителя (раствор Райта с DPBS (1 : 1)).
15. Держите предметное стекло в горизонтальном положении в течение 10–15 минут, периодически дуйте на него.
16. Слейте раствор красителя и быстро и аккуратно промойте предметное стекло в водопроводной воде, а затем высушите на воздухе.
17. После достижения желаемого уровня окраски и полного высыхания предметного стекла его можно при желании заключить в стабильную гистологическую среду.
18. Исследуйте образец под световым микроскопом, используя объектив с иммерсионным маслом 100x. Рекомендуется исследовать не менее 500 сперматозоидов в образце.

Результаты

Ореолы сперматозоидов в образцах могут быть классифицированы в соответствии с критериями, изложенными в документе Фернандеса и др. (25):

- **Большой:** ширина ореола равна малому диаметру ядра или превышает его;
- **Средний:** размер ореола находится между крупными и малыми ореолами;
- **Малый:** ширина ореола равна или меньше одной трети малого диаметра ядра;



- **Без ореола;**

- **Без ореола-деградированные:** без ореола и с неравномерно или слабо окрашенным ядром. Эта категория связана с тяжелыми повреждениями, затрагивающими как ДНК, так и белковые соединения.

Результаты должны быть представлены в виде процентной доли каждой категории. Процентная доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК представляет собой сумму сперматозоидов с малым ореолом, без ореола и без ореола-деградированных.

Клиническая интерпретация

Был проведен ряд небольших исследований SCD-теста, в том числе (187), в рамках которых изучалось его клиническое применение. Как и для других исследований ДНК, каждая лаборатория должна установить свой собственный референсный диапазон с использованием соответствующих механизмов контроля, основываясь на прогностической ценности положительных и отрицательных результатов, и четко определить, к чему относится прогностическое значение (например, зачатие, выкидыш или другие события).

Технические примечания

- Использование суспензий сперматозоидов с рекомендуемой концентрацией клеток необходимо для того, чтобы избежать перекрытия сперматозоидов в матрице агарозы и способствовать быстрому подсчету.
- Если условия инкубации тщательно не контролируются, ореолы могут быть потеряны под действием кислоты и лизирующих растворов, что приведет к ложноположительным результатам.
- После высушивания (этап 13) обработанные предметные стекла можно хранить в архивных боксах при комнатной температуре в темноте в течение нескольких месяцев или сразу окрашивать.
- Ядра клеток, у которых отсутствует хвост, должны быть зарегистрированы, но не включены в конечный результат.
- Смешивайте клеточную суспензию с жидкой агарозой, когда она стабилизируется при температуре 37°C, чтобы избежать повреждения клеток под воздействием тепла.
- Параллельно с образцами обработайте контрольную суспензию сперматозоидов с известным уровнем фрагментации ДНК в качестве внутреннего контроля. Эти контрольные образцы можно хранить замороженными в аликвотах.

3.2.3.3 Альтернативный метод

Реагенты

- Препарат агарозы: растворите агарозу (после плавления при 95–100°C) и поместите 100 мкл расплавленной агарозы в пробирки Эппендорфа;
- **BWW** или **HTF**;



- Свежеприготовленный раствор кислотной денатурации (0,08 N HCl);
- Лизирующий раствор: Трис-HCl 0,4 M, NaCl 2 M, ЭДТА 0,05 M и 1%-ный SDS, pH 7,5;
- Дистиллированная H₂O;
- 70%-ный этанол, 90%-ный этанол и 100%-ный этанол;
- Буферный раствор Райта.

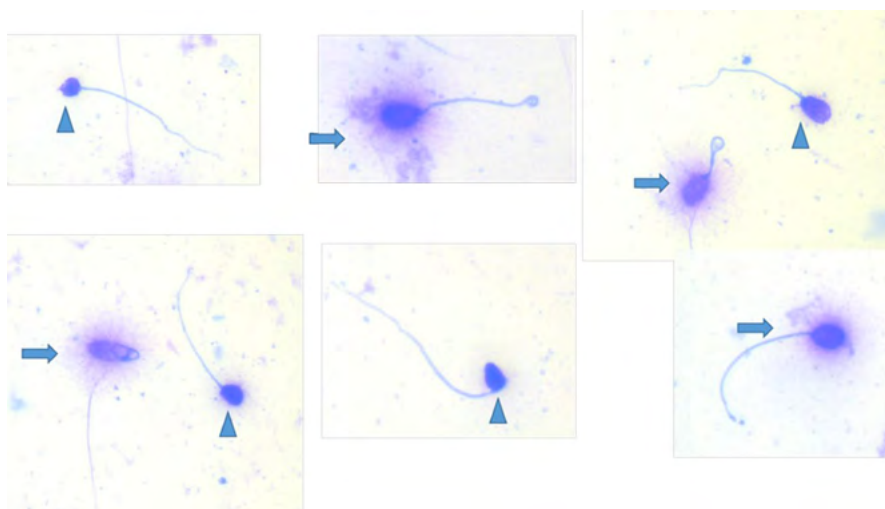
Процедура

1. Предварительно покройте стеклянные предметные стекла 0,65%-ной стандартной агарозой и дайте ей застыть.
2. Разведите образцы эякулята в соответствующей среде (HTF, BWW) до достижения концентрации 5–20 миллионов сперматозоидов/мл.
3. Отмерьте 60 мкл разведенного образца эякулята (содержащего не менее 300 000 сперматозоидов) в пробирки Эппендорфа, содержащие расплавленную агарозу. Тщательно перемешайте. Этот этап должен выполняться при температуре 37°C.
4. Инкубируйте при 37°C в течение 5 минут при комнатной температуре для снижения температуры агарозы.
5. Поместите 8 мкл смеси, содержащей сперматозоиды, на предварительно покрытые агарозой предметные стекла и аккуратно (не надавливая) накройте покровным стеклом. Подержите каждое предметное стекло при температуре 2–8°C в течение 5 минут.
6. Аккуратно снимите покровное стекло, отодвинув его в одну сторону, а затем осторожно удалив в горизонтальном положении.
7. Погрузите предметные стекла в горизонтальном положении в лоток со свежеприготовленным раствором кислотной денатурации (0,08 N HCl) на 7 минут при комнатной температуре в темноте.
8. Выньте предметные стекла из денатурирующего раствора и погрузите их в 25 мл лизирующего раствора (Трис-HCl 0,4 M, NaCl 2 M, ЭДТА 0,05 M и 1%-ный SDS, pH 7,5) на 25 минут при комнатной температуре.
9. Отмойте предметные стекла в дистиллированной воде в течение 5 минут, обновляя воду один или два раза.
10. Выньте предметные стекла из воды, протрите заднюю поверхность каждого из них и поместите их в емкости для предметных стекол, содержащие 70%-ный этанол (на 2 минуты), затем 90%-ный этанол (на 2 минуты) и, наконец, 100%-ный этанол (на 2 минуты).
11. Дайте всем предметным стеклам высохнуть.
12. Проведите окрашивание буферным раствором Райта, дозируя 10–15 капель окрашивающего раствора непосредственно на предметные

стекла, и подождите 15 минут, после чего отмойте предметные стекла дистиллированной водой.

13. Высушите предметные стекла на воздухе и рассмотрите их под световым микроскопом с объективом 40×. Дифференцируйте сперматозоиды с ореолом (неповрежденная ДНК) и сперматозоиды с малым ореолом или без него, как показано на рис. 3.3. Подсчитайте не менее 500 сперматозоидов.

Рис. 3.3 Сперматозоиды с ореолом (неповрежденная ДНК, стрелки) и без ореола (фрагментированная ДНК, наконечники стрелок)



Любезно предоставлено Элизабеттой Балди.

3.2.4 Comet-тест

3.2.4.1 Справочная информация

Comet-тест – это метод оценки ФДС, основанный на дифференциальной миграции разорванных нитей ДНК под воздействием электрического поля в зависимости от заряда и размера нитей (188, 189). Название теста связано с появлением под флуоресцентным микроскопом «кометы» – окрашенных фрагментов размотанной ДНК, которые отделяются от головки сперматозоида после электрофоретического движения.

При использовании этого метода сперматозоиды встраиваются в тонкую агарозную матрицу, где в условиях высокой концентрации соли происходит индуцированный детергентом лизис. Такая обработка экстрагирует ядерные белки, способствуя образованию нуклеоидоподобных структур, которые в щелочных условиях позволяют двухцепочечной ДНК внутри нуклеоидов разматываться. Во время последующего этапа электрофореза разорванные нити ДНК мигрируют к аноду, создавая характерную картину рассеивания, напоминающую хвост кометы. неповрежденная ДНК представляет собой голову кометы, а фрагментированные нити ДНК – хвост кометы. Относительная флуоресценция этого последнего элемента по сравнению с головкой служит показателем уровня повреждения ДНК (190).

Принцип Comet-теста заключается в щелочной денатурации ДНК. Существуют многочисленные разновидности этого теста; процедура, представленная здесь, была описана Саймоном и Кэррелом (190). При использовании этого метода хроматин сперматозоидов деконденсируется, например, с помощью LNN, а затем денатурируется щелочным буфером. В «щелочной» версии Comet-теста с pH не менее 13, наиболее часто используемой в андрологических лабораториях (обзор различных pH, используемых в других протоколах, см. в документе Баумгартнера (191)), щелочно-лабильные сайты преобразуются в разрывы ДНК. Во время электрофореза нити ДНК перемещаются в геле в стороны, образуя хвост кометы. ДНК без разрывов остается в голове кометы. После окрашивания под микроскопом можно увидеть кометоподобные объекты. Подсчет комет можно проводить визуально (192) или с помощью различных программ для подсчета (193, 194). Необходимо оценивать не менее 50 комет на каждом предметном стекле. Имеются также коммерческие наборы и программное обеспечение для обнаружения комет.

3.2.4.2 Реагенты

- Приготовьте по 25 мл 0,5%-ного геля агарозы с нормальной точкой плавления (НортП) (0,250 г агарозы с НортП (0,5%-ного геля) на 25 мл DPBS) и 0,5%-ного геля агарозы с низкой точкой плавления (НизТП) в DPBS (0,125 г агарозы с НизТП (0,5%-ного геля) на 25 мл DPBS), расплавьте при нагревании и поместите в водяные бани с температурой 45°C и 37°C соответственно;
- **DPBS;**
- 250 мл Тритона X-100;
- Лизирующий раствор Трис-HCl 0,4 М, NaCl 2 М, ЭДТА 0,05 М и 1%-ный SDS, pH 7,5;
- Раствор DTT;
- Свежий щелочной раствор для электрофореза (60 мл 10 М NaOH + 10 мл 200 мМ ЭДТА, доведенный до объема 2000 мл с помощью очищенной воды);
- Нейтрализующий буферный раствор (см. **раздел 8.4.1 на стр. 263**);
- Стехиометрическое количество красителя ДНК (например, бромистый этидий, SYBR Green I или окрашивание серебром).



Примечание. Бромистый этидий является мутагенным и канцерогенным интеркалирующим красителем. SYBR Green I – более безопасный интеркалирующий краситель.

3.2.4.3 Процедура

Адаптировано из документа Саймона и Кэррела (190):

1. Нагрейте колбы в микроволновой печи, чтобы расплавить агарозу.
2. Поместите гель с НортП в водяную баню с температурой 45°C, а гель с НизТП – в водяную баню с температурой 37°C.

3. Осторожно нанесите пипеткой 200 мкл геля с НорТП на матовую сторону предметного стекла, сразу же накройте его покровным стеклом и оставьте на столе при комнатной температуре, чтобы агароза затвердела.
4. Доведите концентрацию сперматозоидов до 6×10^6 сперматозоидов/мл с помощью DPBS.
5. Снимите покровные стекла очень осторожно, чтобы не удалить и не нарушить слой агарозы.
6. Поместите 10 мкл образца эякулята (доведенного до объема 6×10^6 /мл с помощью **DPBS**) в пробирку Эппендорфа объемом 0,5 мл и добавьте 75 мкл геля с НизТП, инкубированного при 37°C.
7. Тщательно перемешайте и пипеткой, капля за каплей, нанесите на слой агарозного геля с НорТП.
8. Быстро накройте покровным стеклом и оставьте на столе при комнатной температуре на 15 минут, чтобы агароза затвердела.
9. Достаньте лизирующий раствор из холодильника, добавьте 250 мкл Тритона X-100 и 22,5 мл исходного лизирующего раствора и тщательно перемешайте в емкости Коплина.
10. Снимите покровные стекла с предметных стекол и погрузите последние в лизирующий раствор на 1 час при 4°C.
11. Выньте предметные стекла из емкости Коплина, добавьте 1,25 мл DTT, переверните для обеспечения перемешивания, затем верните стекла в емкость Коплина и инкубируйте в течение 30 минут при 4°C.
12. Выньте предметные стекла из емкости Коплина, добавьте 1,25 мл 4 мМ дейодсалицилата лития (LIS), переверните для обеспечения перемешивания, затем верните стекла в емкость Коплина и инкубируйте в течение 90 минут при комнатной температуре.
13. Выньте предметные стекла и осторожно слейте оставшуюся жидкость, поставив их вертикально на бумажное полотенце, прислонив к опоре.
14. Заполните горизонтальный резервуар для гелевого электрофореза свежим щелочным раствором для электрофореза (60 мл 10 М NaOH + 10 мл 200 мМ ЭДТА, доведенных до объема 2000 мл с помощью очищенной воды).
15. Погрузите предметные стекла в буферный раствор на 20 минут и начните электрофорез, подавая ток при 25 В (0,714 В/см), отрегулированный до 300 мА, добавляя буферный раствор в резервуар или удаляя его из резервуара (± 1 –20 мл) с помощью шприца объемом 20 мл. Проводите электрофорез в течение 10 минут.
16. После электрофореза высушите предметные стекла на бумажном полотенце, как и раньше, поместите их в лоток и залейте тремя порциями нейтрализующего буферного раствора, каждый раз на 5 минут.

17. Тщательно высушите предметные стекла, чтобы удалить нейтрализующий буферный раствор, после чего окрасьте каждое предметное стекло стехиометрическим количеством красителя ДНК (например, добавьте 50 мкл 20 мг/мл EtBr) и накройте покровным стеклом.

18. Осмотрите предметные стекла под микроскопом и проанализируйте 50 комет на каждом стекле (рис. 3.4; 3.5).

3.2.4.4 Результаты

Оцените первые 50 случайно выбранных комет на каждом предметном стекле, используя соответствующее программное обеспечение для подсчета комет. Вместе с тем не считайте кометы с перекрывающимися хвостами. Кометы без головок следует рассматривать как сперматозоиды с ДНК, поврежденной на 100%.

3.2.4.5 Клиническая интерпретация

В нескольких исследованиях сообщалось о диагностических порогах ФДС при оценке с использованием Comet-теста. Такие пороги значительно отличаются друг от друга и зависят от точных условий проведения теста и исследуемого фенотипа (195–198). Как и для других тестов ДНК, каждая лаборатория должна установить свой собственный референсный диапазон с использованием соответствующих механизмов контроля, основываясь на прогностической ценности положительных и отрицательных результатов, и четко определить, к чему относится прогностическое значение (например, зачатие, выкидыш или другие события). Вместе с тем, поскольку Comet-тест включает много методологических этапов, требует высокой квалификации для интерпретации результатов и имеет значительный уровень межлабораторных различий, его использование может быть нецелесообразным для некоторых лабораторий.

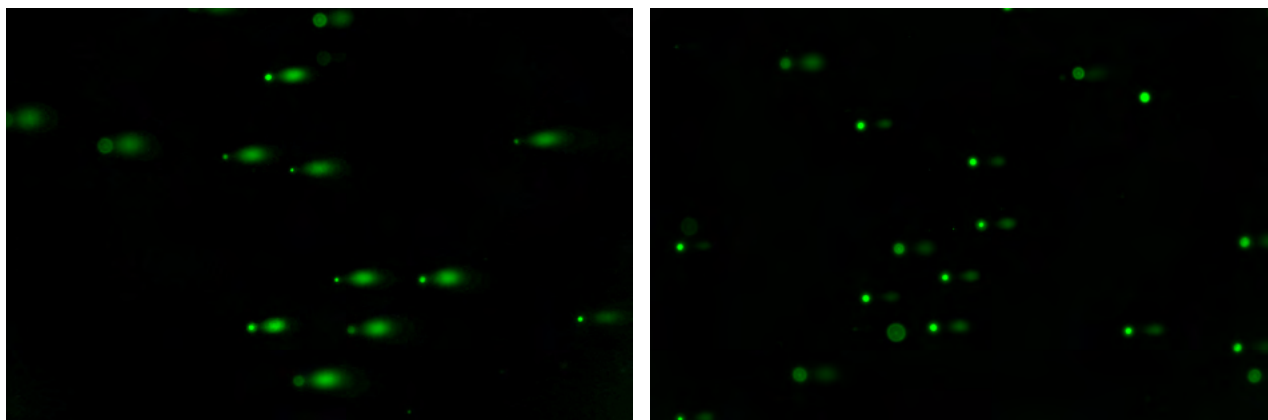
3.2.4.7 Технические примечания

Дополнительную информацию см. в документе Саймона и Кэррела (190).

- Все исходные растворы должны быть приготовлены с использованием бидистиллированной воды и храниться при комнатной температуре, если не указано иное.
- Чтобы сохранить эффективность лизирующего буферного раствора, его не следует хранить более одной недели. Рекомендуется готовить свежий буферный раствор в небольших объемах в зависимости от потребностей на данный момент.
- Остатки агарозы можно использовать в течение 5–7 дней до повышения концентрации из-за испарения воды из геля во время плавления агарозы в микроволновой печи.
- Если при снятии покровного стекла в геле образуется трещина, исследование можно продолжать без каких-либо последствий для результатов теста. Вместе с тем гели с трещинами в большей мере подвержены соскальзыванию.

- Если агарозный гель соскальзывает при выполнении последующих этапов протокола, повысьте концентрацию агарозы с НорТП с 0,5% до 1%. Не изменяйте концентрацию геля с НизТП.
- Для надлежащего лизиса мембран сперматозоидов обеспечьте надлежащее перемешивание Тритона X-100 в лизирующем буферном растворе, осуществляя плавные движения и избегая образования пены.
- Обеспечьте надлежащее перемешивание DTT и дийодосалицилата лития (LIS) в лизирующем буферном растворе, чтобы избежать ложноотрицательных результатов.
- Чувствительность теста снизится, если буферный раствор для электрофореза не будет поддерживаться на уровне pH 13.
- Более высокая концентрация EtBr усилит фоновое окрашивание, что приведет к ухудшению видимости мигрировавших в хвост кометы нитей ДНК.

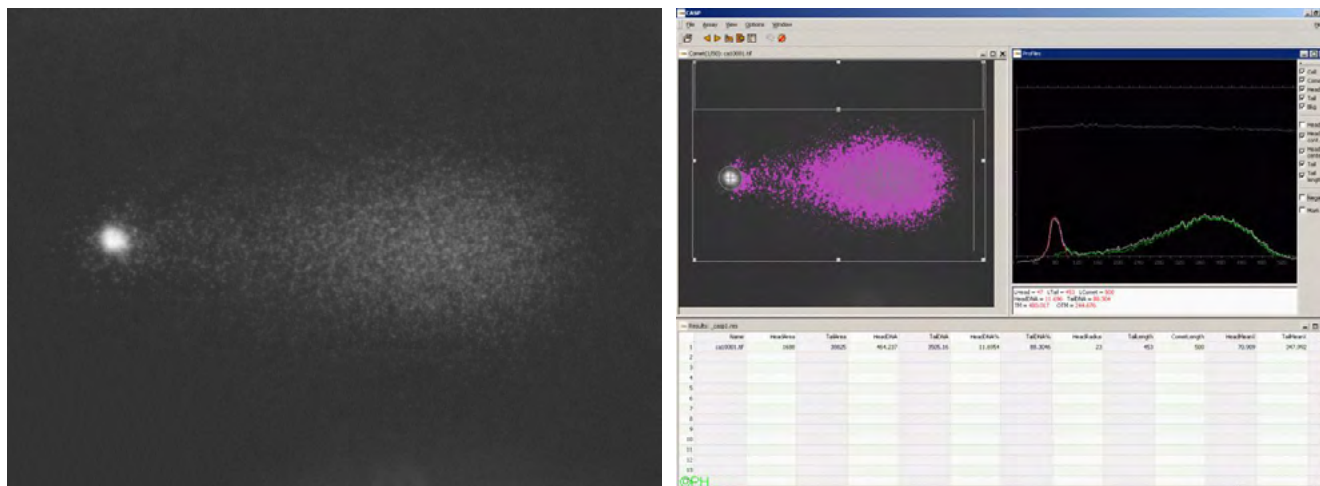
Рис. 3.4 Comet-тест сперматозоидов с аномальной обширной фрагментацией ДНК и нормальных сперматозоидов без видимых повреждений ДНК при окрашивании бромистым этидием



Микрофотографии предоставили Долорес Лэмб и Александр Боляков.

На левой панели показаны результаты Comet-теста сперматозоидов с аномальной обширной фрагментацией ДНК. Сперматозоиды в аномальном образце демонстрируют ярко окрашенные маленькие зеленые пятна (это головки сперматозоидов) и большие более диффузно окрашенные «хвосты кометы», исходящие из головок сперматозоидов. В отличие от этого в нормальном образце ДНК плотно упакована в головках сперматозоидов, фрагментированных ДНК не видно и окрашены только маленькие яркие головки сперматозоидов.

Рис. 3.5 Комета, видимая под микроскопом, и последующая оценка с помощью программного обеспечения CASP (хвост кометы содержит 88% ДНК)



Микрофотографии и результаты исследования предоставил Петр Хуска.

3.2.5 Проточная цитометрия с использованием акридинового оранжевого

3.2.5.1 Справочная информация

Этот метод основан на уникальном свойстве акридинового оранжевого (АО) излучать зеленую флуоресценцию, когда он интеркалирует в двухцепочечные ДНК, и красную флуоресценцию, когда он связан с одноцепочечной ДНК. Данная версия, описанная Эвенсоном (199), может быть использована для оценки свежих и/или замороженных образцов и включает только два основных методологических этапа. На первом этапе сперматозоиды обрабатываются раствором детергента с низким pH (1,2), чтобы денатурировать их хроматин и обеспечить его последующее окрашивание. На втором этапе суспензия сперматозоидов нейтрализуется и клетки окрашиваются вторым раствором, содержащим АО.

Данные по красной и зеленой флуоресценции собираются с помощью проточной цитометрии и преобразуются для определения степени красной флуоресценции в популяции сперматозоидов, известной как индекс фрагментации ДНК (ИФД). Анализ собранных данных может быть выполнен с помощью любого программного обеспечения для проточной цитометрии. Доступно также коммерческое программное обеспечение для проведения этого исследования.

3.2.5.2 Процедуры

Реагенты

- Раствор детергента с низким pH (1,2): 0,08 М HCl, 150 мМ NaCl, 0,1%-ный Тритон X-100, доведенный до pH 1,2 с помощью HCl и/или NaOH;
- Раствор АО для окрашивания, содержащий 6 мг/л очищенного АО, 0,1 М лимонной кислоты, 0,2 М Na_2HPO_4 , 1 мМ динатрия ЭДТА и 150 мМ NaCl, доведенного до pH 6,0 с помощью NaOH. Защитите раствор от света с помощью алюминиевой фольги или янтарного стекла;

- TNE (10 Трис Cl, 150 NaCl и 10 ЭДТА, pH 7,4);
- Подготовьте контейнер со льдом (желательно с крышкой, чтобы образцы оставались в темноте) и поместите в него раствор А0 для окрашивания, TNE и кислотный раствор детергента (если оцениваются замороженные образцы, перед замораживанием их необходимо развести с помощью TNE).

Методология

Адаптировано из документа Эвенсона и документа Эвенсона и Джоста (199–201):

1. Разморозьте контрольный образец и поместите его в контейнер со льдом (о том, как приготовить контрольный образец, см. в документе Эвенсона и Джоста (201)).
2. Запустите проточный цитометр и прогоните уравнивающий буферный раствор А0 в течение 15 минут, затем оцените контрольный образец (о том, как оценивать образцы, см. ниже) и установите чувствительность зеленого и красного фотоэлектронных умножителей на 475 и 125 соответственно.
3. Разведите образцы до $1-2 \times 10^6$ /мл с помощью TNE и поместите их в контейнер со льдом (если измеряются замороженные образцы, их необходимо развести с помощью TNE перед сверхбыстрым замораживанием в LN₂).
4. Пипетируйте 200 мкл разведенного образца в пробирку для проточной цитометрии, добавьте 400 мкл кислотного детергента (включите секундомер точно в момент добавления детергента), осторожно перемешайте и сразу же поместите пробирку обратно в контейнер со льдом.
5. Ровно через 30 секунд добавьте 1,2 мл окрашивающего раствора, перемешайте с помощью наконечника пипетки и сразу же поместите пробирку обратно в контейнер со льдом.
6. Поместите пробирку в проточный цитометр и начните собирать данные с момента, когда на секундомере будет 3 минуты.
7. Повторите процедуру с другим препаратом.
8. Дайте уравнивающему буферному раствору стечь в проточный цитометр и начните готовить следующий образец (для оценки контрольного образца можно объединять до шести образцов).
9. Используйте контрольный образец, чтобы установить чувствительность зеленого и красного фотоэлектронных умножителей на 475 и 125 соответственно.
10. Исследуйте 5000 сперматозоидов в каждом образце при скорости анализа 100–200 клеток в секунду.
11. Когда все образцы будут оценены, промойте проточный цитометр бидистиллированной водой в течение 10 минут, чтобы удалить основную часть А0.
12. Очистите проточный цитометр в соответствии с протоколом, предложенным производителем прибора.



Результаты

Популяция сперматозоидов для анализа данных отбирается путем гейтирования в области прямого/бокового светорассеяния. На следующем этапе цитограмма зеленой флуоресценции двухцепочечной ДНК по отношению к красной флуоресценции одноцепочечной ДНК используется для гейтирования только АО-положительных клеток и исключения из анализа клеточного дебриса и апоптотических телец, в которых отсутствует генетический материал. Последовательно в каждом АО-положительном сперматозоиде рассчитывается изменение зеленой флуоресценции на красную, или ИФД, по формуле:

Индекс фрагментации ДНК (ИФД) = (красная флуоресценция)/(красная флуоресценция + зеленая флуоресценция)

На следующем этапе значения ИФД представляются в виде гистограммы, на которой на основе использования контрольного образца умеренные и высокие значения ИФД могут быть найдены справа от основной популяции клеток. Процентная доля клеток справа, составляющих общее число АО-положительных событий, представляет собой % ИФД – параметр, используемый для клинической интерпретации теста. На гистограмме ИФД представлены также значения среднего и стандартного отклонения для ИФД.

Оценка и клиническая интерпретация

Вряде исследований сообщалось о диагностических порогах ИФД, измеренных с помощью проточной цитометрии с использованием акридинового оранжевого (202, 203). Как и для других тестов ДНК, каждая лаборатория должна установить свой собственный референсный диапазон с использованием соответствующих механизмов контроля, основываясь на прогностической ценности положительных и отрицательных результатов, и четко определить, к чему относится прогностическое значение (например, зачатие, выкидыш или другие события).

Контроль качества

- Проточный цитометр необходимо каждый день настраивать в соответствии с контрольным образцом эякулята, а после повторных исследований образцов пациентов (6–10 образцов) необходимо снова проводить рекалибровку по контрольному образцу.
- Для уравнивания АО с трубками для образцов уравнивающий буферный раствор АО необходимо пропускать через проточные ячейки прибора в течение ~15 минут до оценки образцов и между оценками разных образцов.
- Если при оценке образца частота событий превышает 250 событий в секунду, необходимо приготовить новый образец, чтобы обеспечить точное равновесие между красителем АО и эякулятом.

3.3 Генетические и геномные исследования

На протяжении последних 15 лет становится все более очевидным, что значительная процентная доля случаев мужского бесплодия имеет генетическую или геномную основу. В клинической практике растет понимание того, что в основе широкого спектра причин мужского бесплодия лежат хромосомные аномалии (числовые и структурные [включая микроделеции и микродупликации]) и генные мутации, наблюдаемые при исследовании эякулята. Некоторые андрологические лаборатории проводят генетические и геномные исследования, хотя на более регулярной основе эти исследования проводятся в медицинских генетических лабораториях. Методология большинства генетических и геномных диагностических исследований не является специфичной для дефектов, связанных с семенной жидкостью, за исключением исследований на анеуплоидию сперматозоидов, особая методология которых изложена ниже.

3.3.1 Исследование на анеуплоидию сперматозоидов

3.3.1.1 Справочная информация

Анеуплоидия – это наличие одной или нескольких хромосом выше или ниже обычного числа хромосом. В норме сперматозоиды имеют гаплоидный набор хромосом (22 аутосомы и 1 половая хромосома (X, Y)). Анеуплоидный сперматозоид содержит на одну или несколько аутосом и/или половых хромосом меньше или больше. У неотобранных бесплодных мужчин хромосомная анеуплоидия сперматозоидов встречается в 10 раз чаще, даже при нормальном соматическом кариотипе, из-за проблем с хромосомным расщеплением в процессе мейоза, что приводит к прибавлению (дисомии) или потере (нуллисомии) хромосомы. Из анеуплоидных ооцитов, развивающихся, как известно, у женщин с возрастом, зарождаются анеуплоидные эмбрионы, которые погибают. Единственные анеуплоидии, совместимые с рождением жизнеспособного, но затронутого негативным воздействием ребенка, возникают в результате изменения числа хромосом 13, 18, 21, X и Y. Одной из хорошо известных причин повышенного уровня анеуплоидных сперматозоидов являются робертсоновские транслокации. У мужчин с таким нарушением в одном и том же ядре сперматозоида может наблюдаться накопление числовых хромосомных аномалий и продуктов несбалансированного расщепления (204, 205). Мужчины со сбалансированными реципрокными транслокациями также находятся в группе риска. Преобладающее число носителей сбалансированных реципрокных транслокаций составляют отцы детей с синдромом Дауна (204). Кроме того, повышенная анеуплоидия сперматозоидов связана с повышенным уровнем фрагментации ДНК (206). Другой основной группой являются мужчины в парах с привычным невынашиванием (207). Аномальный уровень анеуплоидных сперматозоидов чаще всего наблюдается у мужчин с нарушениями сперматогенеза, олигозооспермией или олигоастенозооспермией, а также у мужчин с нормозооспермией в парах с привычным невынашиванием.

3.3.1.2 Флуоресцентная гибридизация *in situ*

Флуоресцентная гибридизация *in situ* – это цитогенетический клинический диагностический анализ для оценки частоты хромосомных аномалий. Хромосомы X, Y, 13, 18 и 21 оцениваются в рамках исследования на анеуплоидию



сперматозоидов, поскольку анеуплоидии в этих хромосомах ассоциируются с жизнеспособным, но затронутым негативным воздействием потомством (синдром Клайнфельтера [XXY-XXXXY], синдром Тернера [XO], синдромы Патау [трисомия 13], Эдвардса [трисомия 18] и Дауна [трисомия 21]). Возможно, наиболее информативным был бы анализ всех хромосом, поскольку другие анеуплоидии являются эмбрионально-летальными, но такой подход требует значительных затрат. В качестве скринингового инструмента результат исследования на анеуплоидию сперматозоидов полезен при генетическом консультировании затронутых этой проблемой пар (208) (в частности, пар с привычным невынашиванием или неудачными попытками применения ВРТ и, в меньшей мере, пар с астенотератозооспермией и тяжелой олигозооспермией) и в некоторых случаях позволяет парам принимать обоснованные репродуктивные решения (209). Приведенная ниже методология адаптирована из документа Рио и др. (210).

Реагенты

- SSC (разведенный из 20× SSC) (3 М NaCl, 0,3 М двухводного тринатрийцитрата, pH 7,0);
- 2× SSC (разведенный из 20× SSC);
- Этанол для отмывания (100%-ный и разведенный до 70% и 80%);
- 25 мМ DTT;
- Специфичные для хромосом альфа-сателлитные зонды с прямой меткой (имеется набор многоцветных ДНК-зондов);
- ДАПИ II (ядерный контрастный краситель, 4,6-диамидино2-фенилиндол).

Процедура

По документу Рио и др. (210):

1. Удалите краситель и масло с предметных стекол путем их последовательного помещения в ксилол на 5 минут и этанол на 5 минут, а затем высушите их на воздухе.
2. Фиксируйте ядра в метаноле в течение 15 минут. Инкубируйте предметные стекла в 2× SSC, затем отмойте их в трех растворах этанола (70%, 80% и 100%) по 2 минуты в каждом и высушите на воздухе.
3. Затем инкубируйте предметные стекла в течение 6–8 минут при 37°C в свежеприготовленном растворе 25 мМ DTT, что позволяет головкам сперматозоидов деконденсироваться и набухнуть. Незамедлительно поместите предметные стекла в 2× SSC при комнатной температуре на 3 минуты, затем дегидратируйте их в трех растворах этанола и высушите на воздухе.
4. Проведите пятицветную флуоресцентную гибридизацию *in situ* для выявления хромосом X, Y, 13, 18 и 21 с использованием специфичных для хромосом альфа-сателлитных зондов с прямой меткой, которые имеются в продаже (многоцветные ДНК-зонды).

5. Смесь зондов запечатайте на предметном стекле, а затем поместите в термостат с температурой 80°C на 2–3 минуты для одновременной денатурации клеточной ДНК и зондов.

6. Оставьте на гибридизацию при 37°C до следующего дня, затем отмойте в 0,25× SSC (pH 7,0) при 68°C в течение 10 секунд и ополосните в 1× фосфатном буферном детергенте (многоцветные ДНК-зонды).

7. Нанесите раствор ДАПИ II. Общая эффективность гибридизации должна быть более 97%.

Критерии оценки

- Специфичные для хромосом зонды идентифицируются по цвету, и ядра анализируются на отсутствие и наличие одного, двух или трех и более сигналов для каждого из трех зондов.
- Ядра, содержащие сигналы неожиданного размера или находящиеся за пределами ядерной мембраны, исключаются из анализа.
- Считается, что сигналы представляют собой расщепленный домен, если: (1) размер и интенсивность каждого из двух сигналов меньше, чем у сигнала для другого гомолога; и (2) расстояние между двумя сигналами меньше, чем диаметр любого из двух сигналов. Результаты представляются в виде процентной доли сперматозоидов с дисомией или полисомией (две хромосомы или более), которые в остальном являются гаплоидными. Сперматозоиды с моносомией (с отсутствием целой хромосомы) не учитываются.

Технические примечания

Необходимы автоматизированные системы цитогенетической визуализации, которые повышают точность и аккуратность. Они включают микролокатор и обеспечивают соблюдение целого ряда правил цитологических исследований, позволяющих фиксировать и сворачивать восемь плоскостей резкости для флуоресцентной микроскопии. Программное управление фокусом и экспозицией позволяет охватывать несколько фокальных слоев, максимизировать интенсивность сигнала и поддерживать низкий уровень фонового шума (211).

Статистические расчеты

Распределение сигналов флуоресцентной гибридизации *in situ* в совокупности сравнивается между бесплодной и контрольной группами. Непрерывные переменные анализируются с помощью двухвыборочного независимого Т-теста. Для анализа переменных с неравными вариациями используется ранговый критерий Манна-Уитни. Статистическая значимость определяется как $P < 0,05$ для непрерывного анализа.

Базальные уровни дисомии хромосом сперматозоидов

У фертильных мужчин анеуплоидия сперматозоидов встречается редко. Результаты разных лабораторий, проводящих этот анализ, схожи между собой (таблица 3.3).

Таблица 3.3 Базальные уровни дисомии хромосом сперматозоидов у здоровых фертильных мужчин

Хромосома #	По данным Темпладо и др.	По данным Нейссера и др.	Хромосома #	По данным Темпладо и др.	По данным Нейссера и др.
1	0,08	0,16	13	0,12	0,13
2	0,09	0,09	15	0,10	0,10
3	0,20	0,20	16	0,07	0,12
4	0,08	0,10	18	0,06	0,10
6	0,04	0,07	20	0,12	0,12
7	0,06	0,10	21	0,17	0,21
8	0,03	0,18	22	0,47	0,41
9	0,16	0,13	X,Y	0,27	0,21
12	0,14	0,09			

Адаптировано из документов Темпладо и др. и Нейссера и др. (212, 213)

3.4 Исследования, связанные с иммунологией и иммунологическими методами

3.4.1 Оценка лейкоцитов в семенной жидкости

В большинстве образцов эякулята человека присутствуют лейкоциты, преимущественно полиморфно-ядерные (нейтрофилы) (53, 214). Иногда их можно отличить от сперматид и сперматоцитов в мазке семенной жидкости, окрашенной по Папаниколау (раздел 2.4.9.3 на стр. 55). Дифференциация основана на различиях в окрашивании, а также на размере и форме ядер (53). С точки зрения морфологии полиморфно-ядерные лейкоциты легко спутать с многоядерными сперматидами, но они окрашиваются в голубоватый цвет в отличие от более розоватого цвета сперматид (53). Размер ядра также может помочь в идентификации: ядра моноцитов имеют широкий разброс размеров – от приблизительно 7 мкм для лимфоцитов до более 15 мкм для макрофагов. Эти размеры являются лишь ориентирами, поскольку на размер ядра влияют дегенерация и деление.

Существует несколько других методов количественной оценки популяции лейкоцитов в семенной жидкости. Поскольку преобладающей формой лейкоцитов в семенной жидкости являются пероксидаза-положительные гранулоциты, в качестве метода первоначального скрининга целесообразно проводить обычный анализ активности пероксидазы (53, 215) (см. раздел 3.4.1.1. ниже).

Лейкоциты могут быть дополнительно дифференцированы с помощью более затратных по времени и дорогостоящих иммуноцитохимических исследований для выявления общих антигенов лейкоцитов и сперматозоидов (98, 216) (раздел 3.4.2 на стр. 127).

3.4.1.1 Окрашивание клеточной пероксидазы с помощью орто-толуидина

Этот быстрый и недорогой тест целесообразно проводить для первоначального скрининга на гранулоциты.

Принцип

Традиционно лейкоциты в эякуляте человека подсчитываются с помощью гистохимической процедуры, позволяющей идентифицировать фермент пероксидазу, характерный для гранулоцитов (рис. 3.6). Преимущество этого метода заключается в простоте выполнения, однако он не позволяет обнаружить:

- активированные полиморфно-ядерные лейкоциты, высвободившие свои гранулы; или
- другие типы лейкоцитов, такие как лимфоциты, макрофаги и моноциты, которые не содержат пероксидазу.

Этот тест может быть полезен для дифференциации полиморфно-ядерных лейкоцитов и многоядерных сперматид, которые не содержат пероксидазы (53). Приведенное ниже описание исследования основано на документе Наума и Кардосо (217). Имеется коммерческий набор для проведения этого исследования.

Реагенты

- Фосфатный буферный раствор, 67 ммоль/л, pH 6,0: растворите 9,47 г гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4) в 1000 мл очищенной H_2O и 9,08 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4) в 1000 мл очищенной H_2O . Добавляйте один раствор к другому (примерно 12 мл раствора Na_2HPO_4 к 88 мл раствора KH_2PO_4), пока pH не станет равным 6,0;
- Насыщенный раствор хлорида аммония (NH_4Cl): добавьте 250 г NH_4Cl к 1000 мл очищенной H_2O ;
- 148 ммоль/л двунариевая этилендиаминтетрауксусная кислота (Na_2EDTA): растворите 50 г/л в фосфатном буферном растворе (pH 6,0), подготовленном на этапе 1;
- Субстрат: растворите 2,5 мг о-толуидина в 10 мл 0,9%-ного (9 г/л) солевого раствора;
- Перекись водорода (H_2O_2) 30%-ная (v/v): промышленная;
- Рабочий раствор: к 9 мл раствора о-толуидина добавьте 1 мл насыщенного раствора NH_4Cl , 1 мл 148 ммоль/л Na_2EDTA и 10 мкл 30%-ной (v/v) H_2O_2 и тщательно перемешайте. Этот раствор можно использовать в течение 24 часов после приготовления.



Примечание. Международное агентство по изучению рака (МАИР, 1982 г.) установило, что орто-толуидин, используемый для практических целей, представляет канцерогенный риск для человека. Соблюдайте соответствующие меры предосторожности (раздел 8.2 на стр. 249).

Процедура

1. Тщательно перемешайте образец эякулята (см. техническое примечание ниже).
2. Отберите аликвоту эякулята в объеме 0,1 мл и смешайте с 0,9 мл рабочего раствора (разведение 1+9 (1 : 10)).
3. Осторожно перемешайте суспензию сперматозоидов вихревым способом в течение 10 секунд и инкубируйте при комнатной температуре в течение 20–30 минут. В качестве альтернативы непрерывно встряхивайте с помощью качающейся системы для пробирок.
4. Перемешайте образец эякулята перед тем, как отобрать повторную аликвоту и смешать с рабочим раствором, как указано выше.

Техническое примечание: тщательное перемешивание эякулята

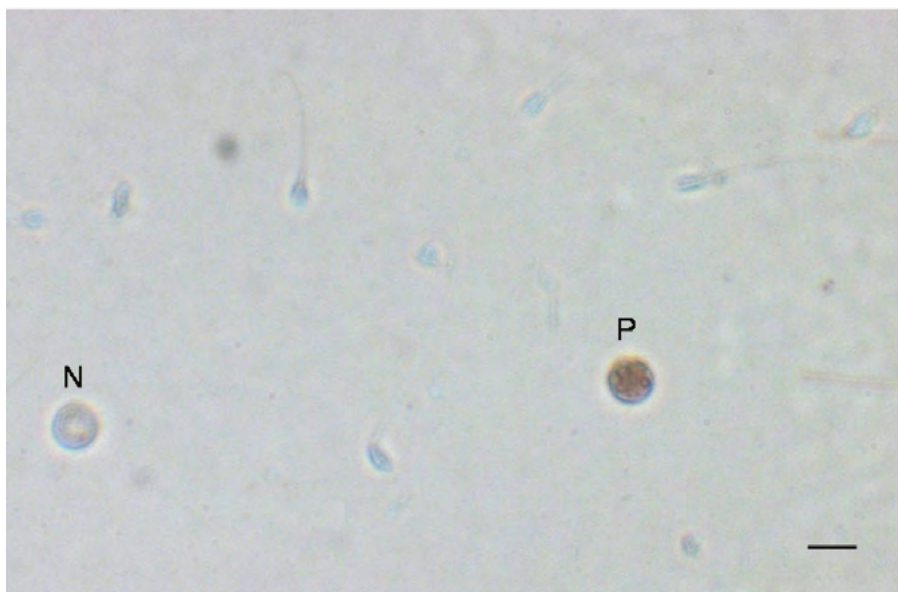
Перед тем как отобрать аликвоту эякулята для оценки, тщательно перемешайте образец в оригинальном контейнере, но не настолько энергично, чтобы образовались пузырьки воздуха. Это может быть обеспечено путем десятикратного всасывания образца в одноразовую пластиковую (при необходимости стерильную) пипетку с широким отверстием (диаметром около 1,5 мм). Не перемешивайте образец с помощью вихревого миксера на высокой скорости, поскольку это может привести к повреждению сперматозоидов.

Оценка числа пероксидаза-положительных клеток в гемоцитометрических камерах

1. Через 20–30 минут снова перемешайте суспензии сперматозоидов и заполните каждую сторону гемоцитометра одним из препаратов.
2. Подержите гемоцитометр в горизонтальном положении не менее 4 минут при комнатной температуре во влажном резервуаре (например, на влажной фильтровальной бумаге в закрытой чашке Петри), чтобы предотвратить высыхание и дать клеткам осесть.
3. Исследуйте камеру квадрат за квадратом с помощью фазово-контрастной оптики при увеличении $\times 200$ или $\times 400$.
4. Подсчитайте не менее 200 пероксидаза-положительных клеток в каждом препарате, чтобы обеспечить приемлемо низкую ошибку выборки (**таблица 2.3 на стр. 39**). Пероксидаза-положительные клетки окрашиваются в коричневый цвет, а пероксидаза-отрицательные клетки не окрашиваются (рис. 3.6).
5. Исследуйте одну камеру квадрат за квадратом и продолжайте подсчет до тех пор, пока не будет обнаружено не менее 200 пероксидаза-положительных клеток и не будет исследован весь квадрат. Подсчет необходимо производить на всей площади квадратов; не останавливайтесь в середине квадрата.
6. Отметьте число квадратов, которые были оценены в процессе подсчета не менее 200 пероксидаза-положительных клеток. В другой камере гемоцитометра подсчет необходимо проводить в таком же числе квадратов.
7. Подсчитайте число пероксидаза-положительных клеток и квадратов с помощью лабораторного счетчика.

8. Перейдите ко второй камере гемоцитометра и выполните подсчет в том же числе квадратов, что и в первой камере, даже если будет подсчитано менее 200 пероксидаза-положительных клеток.
9. Рассчитайте сумму и разность двух чисел пероксидаза-положительных клеток.
10. Определите приемлемость различия по **таблице 2.3 на стр. 39** (максимальное различие между двумя подсчетами, которое, как ожидается, может возникнуть в 95% образцов только из-за ошибки выборки).
11. Если различие приемлемо, рассчитайте концентрацию. Если различие слишком велико, приготовьте два новых разведения и повторите подсчет.
12. Укажите среднюю концентрацию пероксидаза-положительных клеток с точностью до двух значащих цифр.
13. Рассчитайте общее число пероксидаза-положительных клеток в эякуляте (см. **Расчет концентрации пероксидаза-положительных клеток ниже**).

Рис. 3.6 Пероксидаза-положительные клетки в эякуляте человека



Пероксидаза-положительный гранулоцит (P) (коричневый цвет) и пероксидаза-отрицательная округлая клетка (N). Масштабная метка 10 мкм.

Микрофотографию любезно предоставил Т.Г. Купер.

Расчет концентрации пероксидаза-положительных клеток

Концентрацию пероксидаза-положительных клеток в эякуляте рассчитывают как их число (N), разделенное на объем общего числа (n) квадратов, исследованных для подсчета клеток в препаратах (где объем одного квадрата составляет 100 нл), и умноженное на коэффициент разведения.

Для разведения 1+9 (1 : 10) концентрация составляет: $C = (N/n) \times (1/100) \times 10$ клеток на нл = $(N/n) \times (1/10)$ клеток на нл. Таким образом, (N/n) делится на 10, чтобы получить концентрацию пероксидаза-положительных клеток на нл (= миллион клеток на мл).

Когда оцениваются все девять квадратов в каждой камере гемоцитометра, общее число пероксидаза-положительных клеток можно разделить на общий объем обеих камер (1,8 мкл) и умножить на коэффициент разведения (10), чтобы получить концентрацию в клетках на мкл (в тыс. клеток на мл).



Примечание. Эта процедура может быть использована для расчетов концентрации округлых клеток, когда для N берется общее число подсчитанных округлых клеток (пероксидаза-положительных и пероксидаза-отрицательных).

Чувствительность метода

Если в камере обнаружено менее 200 пероксидаза-положительных клеток, ошибка выборки превысит 5%. Если во всех квадратах обеих камер обнаружено менее 400 пероксидаза-положительных клеток, укажите ошибку выборки для числа подсчитанных клеток (**таблица 2.3 на стр. 39**).

Если в каждой камере подсчитано менее 25 пероксидаза-положительных клеток, концентрация будет менее 277 000 клеток/мл. Укажите число наблюдаемых пероксидаза-положительных клеток с комментарием «Слишком мало клеток для точного определения концентрации (менее 277 000/мл)». Отсутствие пероксидаза-положительных клеток в исследуемой аликвоте необязательно означает их отсутствие в остальной части образца.

Примеры с решениями

Пример 1

При разведении 1+9 (1 : 10) препарат 1 содержит 60 пероксидаза-положительных клеток в 9 квадратах, а препарат 2 – 90 пероксидаза-положительных клеток в 9 квадратах. Сумма значений (60+90) равна 150 в 18 квадратах, а разность (90–60) равна 30. Из **таблицы 2.3 на стр. 39** видно, что это превышает различие, ожидаемое только в силу случайности (24), поэтому результаты отбрасываются и готовятся новые препараты.

Пример 2

При разведении 1+9 (1 : 10) препарат 1 содержит 204 пероксидаза-положительные клетки в 5 квадратах, а препарат 2 – 198 пероксидаза-положительных клеток в 5 квадратах. Сумма значений (204+198) равна 402 в 10 квадратах, а разность (204–198) равна 6. Из **таблицы 2.3 на стр. 39** видно, что это меньше различия, полученного только в силу случайности (39), поэтому значения принимаются.

Концентрацию пероксидаза-положительных клеток в образце рассчитывают с помощью **таблицы 2.4 на стр. 41**; для разведения 1+9 (1 : 10) $C = (N/n)/10$ клеток на нл или $(402/10)/10 = 4,02$ клетки/нл, или $4,0 \times 10^6$ клеток на мл (с точностью до двух значащих цифр).

Пример 3

При разведении 1+9 (1 : 10) препарат 1 содержит 144 пероксидаза-положительные клетки в 9 квадратах, а препарат 2 – 162 пероксидаза-положительные клетки в 9 квадратах. Сумма значений (144+162) равна 306 в



18 квадратах, а разность (162–144) равна 18. Из **таблицы 2.3 на стр. 39** видно, что это меньше различия, полученного только в силу случайности (34), поэтому значения принимаются.

Из **таблицы 2.4 на стр. 41** видно, что при оценке всех девяти квадратов в каждой камере концентрация образца при разведении 1+9 (1 : 10) будет следующей: $C = 1,7 \times 10^6$ клеток на мл с точностью до двух значащих цифр. Поскольку было подсчитано менее 400 клеток, укажите ошибку выборки для 306 клеток, приведенную в таблице 2.3 (приблизительно 6%).

Пример 4

При разведении 1+9 (1 : 10) ни в одном из препаратов пероксидаза-положительных клеток не обнаружено. Поскольку во всех 9 квадратах обнаружено менее 25 пероксидаза-положительных клеток, концентрация составляет менее 277 000 на мл; укажите, что «в образцах пероксидаза-положительных клеток не обнаружено. Слишком мало клеток для точного определения концентрации (менее 277 000/мл)».

3.4.1.2 Границы между нормальным и патологическим результатом

В настоящее время не существует основанных на фактических данных референсных диапазонов для пероксидаза-положительных клеток в эякуляте фертильных мужчин. До получения дополнительных данных в настоящем руководстве в качестве порогового значения, имеющего клиническую значимость, по-прежнему используется консенсусное значение $1,0 \times 10^6$ пероксидаза-положительных клеток на мл. В соответствии с этим значения, превышающие или равные $1,0 \times 10^6$ пероксидаза-положительных клеток на мл, считаются аномальными. С этим исследованием связано несколько важных аспектов:

- Общее число пероксидаза-положительных клеток в эякуляте может характеризовать степень тяжести воспалительного заболевания (215). Число пероксидаза-положительных клеток получают путем умножения концентрации пероксидаза-положительных клеток на объем эякулята.
- Данные о пороговых значениях пероксидаза-положительных клеток у фертильных мужчин варьируются от $0,5 \times 10^6$ до $1,0 \times 10^6$ полиморфно-ядерных лейкоцитов/мл или от 1×10^6 до 2×10^6 общих лейкоцитов/мл (215). В предыдущих изданиях данного руководства в качестве порогового значения лейкоцитоспермии принималось значение 1×10^6 лейкоцитов/мл. Некоторые исследователи считают это значение слишком низким (215), в то время как другие – слишком высоким (218, 219), что зависит от конечной точки исследования (качество семенной жидкости, результаты ЭКО, наличие бактерий, реакция сперматозоидов на активные формы кислорода).
- Избыточное количество лейкоцитов в эякуляте (лейкоцитоспермия, пиоспермия) может быть связано с инфекцией и плохим качеством семенной жидкости.
- Связанное с лейкоцитами повреждение сперматозоидов зависит от общего числа лейкоцитов в эякуляте и от соотношения числа лейкоцитов с числом сперматозоидов.

- Лейкоциты могут снижать подвижность сперматозоидов и нарушать целостность ДНК посредством окислительной атаки (**раздел 4.1 на стр. 158**). Однако тот факт, приводит ли наблюдаемый уровень лейкоцитарной инфильтрации к повреждениям или нет, зависит от факторов, которые невозможно определить по образцу эякулята, таких как причина, время и анатомическая локализация инфильтрации, а также свойства таких лейкоцитов и их нахождение в активированном состоянии (214, 220, 221).

3.4.2 Иммуноцитохимическое окрашивание панлейкоцитов (CD45)

Полиморфно-ядерные лейкоциты, высвободившие свои гранулы, и другие виды лейкоцитов, такие как лимфоциты, макрофаги или моноциты, которые не содержат пероксидазу, не могут быть обнаружены путем окрашивания клеточной пероксидазы о-толуидином (**раздел 3.4.1.1 на стр. 122**), но могут быть обнаружены иммуноцитохимическим методом. Иммуноцитохимическое окрашивание является более дорогостоящим и трудоемким методом, чем оценка пероксидазной активности гранулоцитов, но его целесообразно использовать для различения лейкоцитов и половых клеток.

3.4.2.1 Принцип

Все типы лейкоцитов человека экспрессируют специфический антиген (CD45), который может быть обнаружен с помощью соответствующего моноклонального антитела. На основе изменения свойств первичного антитела эта общая процедура может быть адаптирована для обнаружения различных типов лейкоцитов, таких как макрофаги, моноциты, нейтрофилы, В-клетки или Т-клетки, если они являются предметом исследования.

3.4.2.2 Реагенты

- DPBS;
- Трис-буферный солевой раствор (**TBS** – см. **раздел 8.4 на стр. 263**), pH 8,2;
- Тетрамизол-HCl (левализол) 1,0 моль/л: растворите 2,4 г левализола в 10 мл очищенной воды;
- Субстрат: к 9,7 мл TBS (pH 8,2) добавьте 2 мг нафтола AS-MX фосфата, 0,2 мл диметилформамида и 0,1 мл левализола 1,0 моль/л. Непосредственно перед использованием добавьте 10 мг быстрой красной соли TR и отфильтруйте (размер пор 0,45 мкм);
- Фиксатор: только ацетон или ацетон/метанол/формальдегид: к 95 мл ацетона добавьте 95 мл абсолютизированного метанола и 10 мл 37%-ного (v/v) формальдегида;
- Первичные антитела: моноклональные антитела мыши к общему антигену лейкоцитов, обозначаемому CD45;
- Вторичные антитела: антитела кролика к иммуноглобулинам мыши. Разведение зависит от титра антител и источника;



- Комплекс щелочной фосфатазы/антищелочной фосфатазы (АРААР);
- Смесь для окрашивания **гематоксилином Харриса** (в качестве контрастного вещества).

3.4.2.3 Процедура

Подготовка эякулята

1. Тщательно перемешайте образец семенной жидкости без образования пузырьков воздуха.
2. Смешайте аликвоту объемом примерно 0,5 мл с пятью объемами DPBS.
3. Центрифугируйте при 500g в течение 5 минут, удалите супернатант и суспендируйте осадок сперматозоидов в пятикратном объеме **DPBS**.
4. Центрифугируйте при 500g в течение 5 минут.
5. Повторите эту процедуру еще раз и ресуспенсируйте осадок в DPBS, доводя концентрацию примерно до 50×10^6 сперматозоидов на мл.

Подготовка мазков эякулята

1. Сделайте мазки на чистых предметных стеклах (**раздел 2.4.7.1 на стр. 31**) из аликвот суспензии объемом 5 мкл и дайте им высохнуть на воздухе.
2. Фиксируйте высушенные на воздухе клетки в абсолютном ацетоне в течение 10 минут или в ацетоне/метаноле/формальдегиде в течение 90 секунд.
3. Отмойте дважды с помощью TBS и дайте ему стечь.
4. Затем предметные стекла можно сразу окрасить или завернуть в алюминиевую фольгу и хранить при температуре -70°C для последующего исследования.

Инкубация с антителами

1. На каждом предметном стекле отметьте область зафиксированных клеток (круг диаметром около 1 см) карандашом для стекла и покройте эту область 10 мкл первичного моноклонального антитела.
2. Подержите предметные стекла в горизонтальном положении в течение 30 минут при комнатной температуре во влажном резервуаре (например, на влажной фильтровальной бумаге в закрытой чашке Петри), чтобы предотвратить высыхание.
3. Отмойте предметные стекла дважды с помощью TBS и дайте ему стечь.
4. Покройте тот же участок мазка 10 мкл вторичного антитела и инкубируйте в течение 30 минут во влажном резервуаре при комнатной температуре.
5. Отмойте дважды с помощью TBS и дайте ему стечь.
6. Добавьте 10 мкл АРААР на ту же область.



7. Инкубируйте в течение 1 часа во влажном резервуаре при комнатной температуре.
8. Отмойте дважды с помощью TBS и дайте ему стечь.
9. Инкубируйте с 10 мкл субстрата нафтола-фосфата в течение 20 минут во влажном резервуаре при комнатной температуре.



Примечание. Для усиления продукта реакции окрашивание вторичным антителом и АРААР можно повторить с 15-минутным периодом инкубации для каждого реагента.

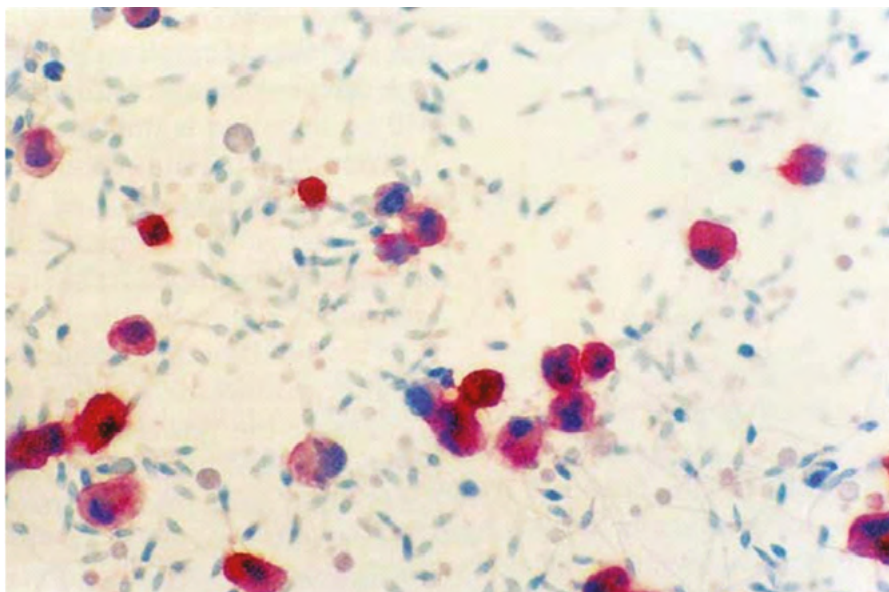
Контрастное окрашивание и заключение в гистологическую среду

1. Как только предметные стекла приобретут красноватый цвет, отмойте их с помощью TBS.
2. Проведите контрастное окрашивание гематоксилином в течение нескольких секунд; промойте в водопроводной воде и заключите в водную гистологическую среду (**раздел 2.4.9 на стр. 48**).

Оценка числа CD45-положительных клеток

1. Исследуйте всю окрашенную область предметного стекла под световым микроскопом при увеличении $\times 200$ или $\times 400$. CD45-положительные клетки (лейкоциты) окрашены в красный цвет (рис. 3.7).
2. Подсчитывайте CD45-положительные клетки и сперматозоиды отдельно до тех пор, пока в каждом препарате не будет подсчитано не менее 200 сперматозоидов, чтобы обеспечить приемлемо низкую ошибку выборки (**таблица 2.3 на стр. 39**).
3. Подсчитайте число CD45-положительных клеток и сперматозоидов с помощью лабораторного счетчика.
4. Оцените второй мазок таким же образом (пока не будет подсчитано 200 сперматозоидов).
5. Рассчитайте сумму и разность подсчитанных чисел CD45-положительных клеток в двух препаратах.
6. Определите приемлемость различия по **таблице 2.3 на стр. 39** (максимальное различие между двумя подсчетами, которое, как ожидается, может возникнуть в 95% образцов только из-за ошибки выборки).
7. Если различие приемлемо, рассчитайте концентрацию (**таблица 2.4 на стр. 41**). Если различие слишком велико, проведите повторную оценку предметных стекол с препаратами.
8. Укажите среднюю концентрацию CD45-положительных клеток с точностью до двух значащих цифр.
9. Умножьте концентрацию CD45-положительных клеток на объем эякулята (мл), чтобы получить общее число CD45-положительных клеток в эякуляте.

Рис. 3.7 Лейкоциты в эякуляте



Клетки, несущие CD45, (лейкоциты) окрашены в красный цвет.

Микрофотографию любезно предоставил Р. Дж. Айткен.

Расчет концентрации

Концентрация CD45-положительных клеток рассчитывается по отношению к концентрации сперматозоидов. Если N – число CD45-положительных клеток, подсчитанных в том же числе полей, что и 400 сперматозоидов, а S – концентрация сперматозоидов в миллионах на мл, то концентрацию (C) CD45-положительных клеток в миллионах на мл можно рассчитать по формуле $C = S \times (N/400)$.

Примеры с решениями

Пример 1

В препарате 1 на 200 сперматозоидов приходится 20 CD45-положительных клеток, а в препарате 2 на 200 сперматозоидов приходится 40 CD45-положительных клеток. Сумма значений (20+40) равна 60, а разность (40–20) равна 20. Из **таблицы 2.3 на стр. 39** видно, что это превышает различие, ожидаемое только в силу случайности (15), поэтому результаты отбрасываются, и делаются новые оценки.

Пример 2

В препарате 1 на 200 сперматозоидов приходится 25 CD45-положительных клеток, а в препарате 2 на 200 сперматозоидов приходится 35 CD45-положительных клеток. Сумма значений (25+35) равна 60, а разность (35–25) равна 10. Из **таблицы 3.4 на стр. 138** видно, что это меньше различия, ожидаемого только в силу случайности (15), поэтому результаты принимаются.

При наличии 60 CD45-положительных клеток на 400 сперматозоидов и концентрации сперматозоидов 70×10^6 клеток/мл концентрация CD45-положительных клеток будет следующей: $C = S \times (N/400)$ клеток/мл = $70 \times 10^6 \times (60/400) = 10,5 \times 10^6$ клеток/мл, или 10×10^6 клеток/мл с точностью до двух значащих цифр. Поскольку было подсчитано менее 400 клеток, укажите ошибку выборки для 60 клеток, приведенную в **таблице 2.3 на стр. 39** (приблизительно 13%).

3.4.2.4 Границы между нормальными и патологическими результатами

В настоящее время не существует научно обоснованных референсных значений для CD45-положительных клеток в эякуляте фертильных мужчин. Согласованное пороговое значение $1,0 \times 10^6$ клеток/мл для пероксидаза-положительных клеток предполагает более высокую концентрацию общих лейкоцитов, поскольку не все лейкоциты являются пероксидаза-положительными гранулоцитами.

3.5 Оценка интерлейкинов – маркера воспаления мужских половых путей

3.5.1 Справочная информация

Хронические воспалительные заболевания мужских половых путей (МПП) являются одной из основных причин нарушения фертильности. Характеристики эякулята пациентов, страдающих инфекциями/воспалительными заболеваниями МПП, включают наличие лейкоцитов в количестве более 1 млн/мл и повышенную вязкость, а наиболее частым клиническим симптомом, о котором сообщают пациенты, является хроническая тазовая боль. Инфекции/воспалительные заболевания МПП могут нарушать фертильность, повреждая сперматозоиды путем прямого воздействия медиаторов воспаления или активных форм кислорода (АФК), производимых воспалительными клетками, или изменяя микросреду МПП.

Хемокины – это большое семейство малых цитокинов, состоящее из двух подсемейств – СХС и СС, – которые различаются по положению первых двух цистеинов: в СХС они разделены одной аминокислотой, а в СС они располагаются рядом. Хемокины вырабатываются несколькими типами клеток, включая моноциты, активированные Т-лимфоциты и нейтрофилы, и действуют синергически или аддитивно на функции клеток-мишеней.

Для углубленной диагностики бесплодия у мужчин, страдающих воспалительными заболеваниями МПП, андрологам и урологам может потребоваться оценка хемокинов и цитокинов в семенной жидкости. В ряде исследований сообщается об изменениях цитокинов и хемокинов в семенной жидкости при простатите и других воспалительных заболеваниях МПП. Исследователи Пенна и др. определили количественные уровни содержания восьми цитокинов и девяти хемокинов в семенной плазме путем мультиплексного анализа в группах контроля и мужчин с симптомами хронического простатита или синдромом хронической тазовой боли. Они обнаружили, что наилучшим показателем для диагностики обоих состояний с высокой точностью и чувствительностью является уровень IL-8. В продаже имеется несколько наборов для измерения уровней содержания интерлейкинов (IL) в сыворотке, плазме и супернатанте клеточных культур, которые могут быть легко адаптированы для исследования эякулята.

3.5.2 Протокол

Принцип: для измерения IL методом ИФА используются биотинилированные антитела человека к IL.



3.5.2.1 Реагенты

- Покрывающий буферный раствор: 0,1 М карбоната натрия, pH 9,5;
- 8,4 г NaHCO_3 + 3,56 г Na_2CO_3 + 1 л дистиллированной H_2O (pH 9,5);
- Буферный раствор PBS, pH 7;
- Буферный раствор для разведения: **DPBS** с 10%-ной фетальной бычьей сывороткой, pH 7;
- Отмывочный буферный раствор: DPBS с 0,05%-ным TWEEN 20;
- Раствор субстрата: тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись водорода (Sigma T0440, готовая к использованию);
- Стоп-раствор: 1 М H_3PO_4 или 2 N H_2SO_4 .

3.5.2.2 Подготовка реагентов

- Покрывающий раствор: захватывающие антитела, антитела человека к IL (разведенные в покрывающем буфере).
- Раствор А/В: 50 мкл идентифицирующих антител (биотинилированные антитела человека к IL, надлежащим образом разведенные в буфере для разведения) + 50 мкл ферментного реагента (стрептавидин-конъюгат пероксидазы хрена) + 12,4 мл буфера для разведения. Можно использовать коммерческие антитела человека к IL.

3.5.2.3 Процедура

- День 1: нанесите покрытие на планшет, добавив антитела к IL в покрывающем буфере в каждую лунку, накройте планшет и инкубируйте до следующего дня при 4°C.
- День 2:
 - Отмойте планшет три раза с помощью 300 мкл отмывочного буфера.
 - Добавьте 200 мкл буфера для разведения и оставьте при комнатной температуре на 1 час.
 - Переверните планшет и снова трижды отмойте с помощью 300 мкл отмывочного буфера.
 - Добавьте стандартные растворы IL (0,1–1–10–50–100–500 пг/мл) или образцы эякулята (в некоторых случаях может потребоваться разведение) в соответствующие лунки и инкубируйте в течение 2 часов при комнатной температуре.
 - Переверните планшет и отмойте пять раз с помощью 300 мкл отмывочного буфера.

- Добавьте 100 мкл раствора анилинового синего (АВ) и инкубируйте 1 час при комнатной температуре.
- Переверните планшет и отмойте семь раз с помощью 300 мкл отмывочного буфера, выдерживая каждый раз не менее 30 секунд.
- Добавьте 100 мкл раствора субстрата и инкубируйте в темноте в течение 30 минут при комнатной температуре.
- Добавьте 50 мкл стоп-раствора.
- Считывайте оптическую плотность при длине волн 450 нм и 570 нм в течение 30 минут. Вычтите значение оптической плотности при 570 нм из значения оптической плотности при 450 нм. Постройте калибровочную кривую и считывайте значения оптической плотности каждого образца эякулята.

3.6 Оценка незрелых половых клеток в эякуляте

К половым клеткам относятся округлые сперматиды и сперматоциты и редко сперматогонии. Они могут быть обнаружены в окрашенных мазках эякулята, но их бывает трудно отличить от воспалительных клеток, когда клетки дегенерируют. В четвертом издании «Лабораторного руководства ВОЗ по исследованию эякулята человека и взаимодействия спермы и цервикальной слизи» отмечалось, что число незрелых половых клеток, превышающее 6 миллионов/мл, является аномальным (4). Это значение более не приводится в качестве справочного из-за отсутствия надежной доказательной базы для этого порогового значения.

Иногда сперматиды и сперматоциты можно отличить от лейкоцитов в мазке эякулята, окрашенном по Папаниколау (53). Идентификация может быть основана на окрашивании, размере и форме ядер, отсутствии внутриклеточной пероксидазы и отсутствии специфических антигенов лейкоцитов. С точки зрения морфологии многоядерные сперматиды можно легко спутать с полиморфно-ядерными лейкоцитами, но они окрашиваются в розоватый цвет в отличие от более голубоватых полиморфно-ядерных лейкоцитов (53). Округлые сперматиды могут быть идентифицированы с помощью красителей, специфичных для развивающейся акросомы (222), лектинов или специфических антител (216, 223).

Размер ядра может также помочь в идентификации: сперматогонии (крайне редко наблюдаемые в эякуляте) имеют ядро размером около 8 мкм, тогда как размер ядра сперматоцитов около 10 мкм, а сперматид – около 5 мкм. Эти размеры являются лишь ориентирами, поскольку на размер ядра влияют дегенерация и деление.



3.7 Исследования для обнаружения сперматозоидов, покрытых антителами

Если сперматозоиды демонстрируют агглютинацию (т.е. подвижные сперматозоиды прилипают друг к другу головка к головке, хвост к хвосту или смешанным образом), одной из возможных причин, которую необходимо исследовать, является наличие антиспермальных антител. Следует отметить несколько важных аспектов в отношении антител.

- Антиспермальные антитела могут присутствовать без агглютинации сперматозоидов; в равной мере агглютинация может быть вызвана другими факторами, отличными от антиспермальных антител.
- Одного наличия антиспермальных антител недостаточно для постановки диагноза аутоиммунного бесплодия. Необходимо убедиться в том, что антитела в значительной мере нарушают функцию сперматозоидов; обычно это делается с помощью теста на проникновение сперматозоидов в цервикальную слизь. Антитела могут также препятствовать гемизональному связыванию и акросомной реакции. Наличие антиспермальных антител (АСАТ) может также препятствовать прохождению сперматозоидов через цервикальную слизь (224).

АСАТ, обнаруживаемые в семенной жидкости, принадлежат почти исключительно к двум классам иммуноглобулинов: IgA и IgG. Антитела класса IgM из-за их более крупного размера и основной функции на острой стадии инфекции редко обнаруживаются в эякуляте. Антитела IgA могут иметь более важное клиническое значение, чем антитела IgG (225), но более чем 95% образцов, содержащих антиспермальные антитела IgA, положительны также на IgG. Оба класса могут быть обнаружены на сперматозоидах или в биологических жидкостях с помощью соответствующих скрининговых тестов.

- Исследования для обнаружения антител на сперматозоидах («прямые исследования»). Здесь приводятся два прямых исследования: тест на смешанную антиглобулиновую реакцию (MAR-тест) (обзор см. в документе Бронсона и др. (226, 227)) и иммуногранулотест (IB-тест) (228, 229). MAR-тест проводится на образце свежего эякулята, а для IB-теста используются отмытые сперматозоиды. Результаты этих двух тестов не всегда совпадают (230-233), но результаты IB-теста хорошо коррелируют с результатами теста на реакцию иммобилизации, который выявляет антитела в сыворотке. Экспериментальные протоколы для IB-теста и MAR-теста отличаются, но в обоих случаях под микроскопом исследуется препарат эякулята/гранул. Гранулы прилипают к подвижным и неподвижным сперматозоидам, которые имеют поверхностно-связанные антитела; регистрируется процентное содержание подвижных сперматозоидов, покрытых гранулами.
- Исследования для обнаружения АСАТ в жидкостях, свободных от сперматозоидов, т.е. в семенной плазме, сыворотке крови и солюбилизированной цервикальной слизи («косвенные» исследования). В этих тестах разбавленная термоинактивированная жидкость, предположительно содержащая АСАТ, инкубируется со сперматозоидами донора, не содержащими антител, которые были отмыты от семенной жидкости. Любые АСАТ в исследуемой жидкости специфически связываются со сперматозоидами донора, которые затем оцениваются в рамках прямого теста, как описано выше. Для получения надежных результатов важно выделить достаточное время для взаимодействия сперматозоидов и



антител, поскольку на то, чтобы смешанная агглютинация стала видимой, может потребоваться до 10 минут. Вместе с тем следует иметь в виду, что подвижность сперматозоидов со временем снижается, а результаты тестов зависят от наличия подвижных сперматозоидов.

- Проникновение сперматозоидов в цервикальную слизь и оплодотворение *in vivo* значительно ухудшаются, если 50% или более подвижных сперматозоидов покрыты антителами (224, 234). Связывание частиц, ограниченное кончиком хвоста, не связано с нарушением фертильности и может присутствовать у фертильных мужчин (235).



Примечание 1. Описанные здесь MAR-тесты доступны в продаже в отличие от IB-теста; вместе с тем IB-тесты можно сделать в лаборатории. Оба теста зависят от наличия подвижных сперматозоидов. Если подвижных сперматозоидов недостаточно, необходимо проводить косвенные тесты на семенной плазме или сыворотке крови.



Примечание 2. Цитотоксические антитела, которые убивают все сперматозоиды или подавляют их подвижность, не могут быть обнаружены этими методами.

3.7.1 Тест на смешанную антиглобулиновую реакцию

MAR-тест является недорогим, быстрым и чувствительным скрининговым тестом (236), но он менее информативен, чем прямой IB-тест (раздел 3.7.2 на стр. 137).

В MAR-тесте используются «мостиковые» антитела (IgG или IgA), чтобы привести покрытые антителами гранулы в контакт с неотмытыми сперматозоидами в эякуляте, содержащем поверхностные IgG или IgA. Прямые MAR-тесты с использованием IgG и IgA проводятся путем смешивания свежего необработанного эякулята отдельно с латексными частицами (гранулами) или обработанными эритроцитами, покрытыми IgG или IgA человека. К суспензиям добавляются моноспецифические антитела IgG или IgA человека. Образование смешанных агглютинатов между частицами и подвижными сперматозоидами указывает на присутствие антител IgG или IgA на сперматозоидах. (Агглютинация между гранулами служит положительным контролем для распознавания реакции «антитело-антиген»).

3.7.1.1 Процедура

1. Тщательно перемешайте образец эякулята без образования пузырьков.
2. Отберите аликвоты по 3,5 мкл эякулята и поместите их на отдельные предметные стекла микроскопа.
3. Включите в каждый прямой тест по одному предметному стеклу с 3,5 мкл АСАТ-положительного и АСАТ-отрицательного эякулята в качестве контроля. Эти образцы эякулята должны быть собраны мужчинами с АСАТ и без АСАТ соответственно, как показано в предыдущем описании прямого MAR-теста. В качестве альтернативы положительные сперматозоиды могут быть получены путем инкубации в сыворотке, содержащей антитела.



4. Добавьте 3,5 мкл латексных частиц (гранул), покрытых IgG, в каждую каплю исследуемого и контрольного образца эякулята и перемешайте кончиком пипетки.
5. Добавьте 3,5 мкл антисыворотки против IgG человека в каждую смесь эякулята с гранулами и перемешайте кончиком пипетки.
6. Накройте суспензию покровным стеклом (22 мм × 22 мм), чтобы обеспечить глубину приблизительно 20 мкм.
7. Подержите предметное стекло в горизонтальном положении в течение 3 минут при комнатной температуре во влажном резервуаре (например, на влажной фильтровальной бумаге в закрытой чашке Петри), чтобы предотвратить высыхание.
8. Исследуйте влажный препарат с помощью фазово-контрастной оптики при увеличении ×200 или ×400 через 3 минуты и снова через 10 минут.
9. Повторите процедуру, используя вместо гранул, покрытых IgG, гранулы, покрытые IgA, а вместо антител IgG антитела IgA.

3.7.1.2 Оценка

Если на поверхности сперматозоидов имеются антитела, латексные гранулы будут прилипать к ним. Вначале будет видно, что подвижные сперматозоиды перемещаются с несколькими или даже группой прикрепленных частиц. В конечном итоге агглютинаты становятся настолько массивными, что движение сперматозоидов резко ограничивается. Сперматозоиды, не покрытые антителами, можно увидеть свободно плавающими между частицами.

Целью исследования является определение процентной доли подвижных сперматозоидов с прикрепленными к ним гранулами. Общая проблема возникает с непрогрессивно подвижными сперматозоидами, которые находятся рядом с гранулами, но не прикрепляются к ним. Чтобы проверить, связаны ли гранулы, можно слегка постучать по покровному стеклу маленьким наконечником пипетки: движение гранул вместе с активными сперматозоидами свидетельствует о положительном связывании.

1. Подсчитайте только подвижные сперматозоиды и определите процентную долю подвижных сперматозоидов, к которым прикреплены две или более латексных частиц. Оставляйте без внимания связывание, ограниченное кончиком хвоста.
2. Оцените не менее 200 подвижных сперматозоидов в каждом препарате, чтобы достичь приемлемо низкой ошибки выборки.
3. Рассчитайте процентную долю подвижных сперматозоидов, к которым прикреплены частицы.
4. Укажите класс (IgG или IgA) и место связывания латексных частиц со сперматозоидами (головка, средняя часть, основная часть).



Примечание 1. Если 100% подвижных сперматозоидов окажутся связанными с гранулами через 3 минуты, считайте это результатом теста; не проводите повторное считывание через 10 минут.



Примечание 2. Если менее 100% подвижных сперматозоидов окажутся связанными с гранулами через 3 минуты, считайте предметное стекло еще раз через 10 минут.



Примечание 3. Если через 10 минут сперматозоиды окажутся неподвижными, возьмите за результат значение, полученное через 3 минуты.

3.7.1.3 Границы между нормальными и патологическими результатами

В настоящее время не существует основанных на фактических данных референсных значений для связанных с антителами сперматозоидов, полученных в результате MAR-теста эякулята фертильных мужчин. Как и в отношении других клинических лабораторных диагностических исследований, каждая лаборатория должна определить свои обычные референсные диапазоны путем тестирования достаточно большого числа фертильных мужчин с нормальным эякулятом.

3.7.2 Иммуногранулотест

В настоящее время коммерческих ИВ-тестов не существует, поэтому иммуногранулы должны быть изготовлены в лаборатории с использованием гранул CNBr-активированной сефарозы для конъюгации с антителами IgG или IgA человека в соответствии с протоколами производителей. Валидация и проверка функциональности тест-системы должны также проводиться лабораторией. Процесс и контроль изготовления иммуногранул здесь не приводятся.

3.7.2.1 Прямой иммуногранулотест

Это исследование является более трудоемким, чем MAR-тест, но оно позволяет получить информацию об антителах на сперматозоидах, извлеченных из возможных маскирующих компонентов в семенной плазме.

В прямом ИВ-тесте гранулы, покрытые ковалентно связанными антителами кролика к иммуноглобулинам IgG или IgA человека, смешиваются непосредственно с отмытыми сперматозоидами. Связывание гранул, покрытых антителами IgG или IgA человека, с подвижными сперматозоидами указывает на присутствие антител IgG или IgA на поверхности сперматозоидов.

Реагенты

1. **DPBS**–BSA или раствор **Тироде**–BSA (**раздел 8.4 на стр. 263**);
2. Буферный раствор 1: добавьте 0,3 г пятой фракции Кона BSA к 100 мл DPBS или среды Тироде;
3. Буферный раствор 2: добавьте 5 г пятой фракции Кона BSA к 100 мл DPBS или среды Тироде;



- Отфильтруйте все растворы через фильтры с порами 0,45 мкм и нагрейте до 25–35°C перед использованием.

Подготовка иммуногранул

- Для каждого типа иммуногранул (IgG, IgA) добавьте 0,2 мл суспензии гранул к 10 мл буферного раствора 1 в отдельных центрифужных пробирках.
- Центрифугируйте при 500g или 600g в течение 5–10 минут.
- Слейте и удалите супернатант с отмытых иммуногранул.
- Аккуратно ресуспендируйте гранулы в 0,2 мл буферного раствора 2.

Подготовка сперматозоидов

Объем эякулята, необходимый для этих исследований, определяется на основе концентрации и подвижности сперматозоидов, как показано в таблице 3.4.

Таблица 3.4 Объем эякулята, необходимый для проведения иммуногранулотеста

Концентрация сперматозоидов (в 10 ⁶ /мл)	Доля прогрессивно подвижных сперматозоидов (a+b) (в %)	Требуемый объем эякулята (в мл)
> 50	-	0,2
21-50	> 40	0,4
21-50	< 40 > 10	0,8
10-20	> 40	1,0
10-20	< 40 > 10	2,0
< 10 > 5	> 10	> 2,0

- Тщательно перемешайте эякулят.
- Перенесите необходимое количество эякулята в центрифужную пробирку и доведите объем до 10 мл с помощью буферного раствора 1.
- Центрифугируйте при 500g в течение 5–10 минут.
- Слейте и удалите супернатант с отмытых сперматозоидов.
- Аккуратно ресуспендируйте осадок сперматозоидов в 10 мл свежего буферного раствора 1.
- Центрифугируйте снова при 500g в течение 5–10 минут.
- Слейте и удалите супернатант.
- Аккуратно ресуспендируйте осадок сперматозоидов в 0,2 мл буферного раствора 2.



Примечание 1. Аликвоты объемом более 1,0 мл необходимо отмывать три раза.



Примечание 2. Образцы с низкой долей прогрессивно подвижных сперматозоидов (например, 10% или менее) могут не дать четких результатов. В этом случае проведите косвенный IB-тест (**раздел 3.7.2.2 на стр. 140**).

Процедура

В качестве контроля в каждый тест должны быть включены АСАТ-положительные и АСАТ-отрицательные сперматозоиды. Образцы эякулята должны быть собраны соответственно мужчинами с наличием и отсутствием АСАТ согласно результатам предыдущих прямых IB-тестов.

1. Поместите 5 мкл исследуемой суспензии отмытых сперматозоидов на предметное стекло микроскопа.
2. Подготовьте отдельные предметные стекла с 5 мкл АСАТ-положительных сперматозоидов и 5 мкл АСАТ-отрицательных сперматозоидов.
3. Поместите 5 мкл суспензии иммуногранул IgG рядом с каждой каплей эякулята.
4. Смешайте капли суспензии иммуногранул IgG и эякулята наконечником пипетки.
5. Поместите покровное стекло размером 22 мм × 22 мм на смешанную каплю, чтобы обеспечить глубину приблизительно 20 мкм.
6. Подержите предметные стекла в горизонтальном положении в течение 3–10 минут при комнатной температуре во влажном резервуаре (например, на влажной фильтровальной бумаге в закрытой чашке Петри). Не ждите более 10 минут перед оценкой предметных стекол, поскольку во время инкубации связывание иммуногранул значительно уменьшается (237).
7. Исследуйте предметные стекла с помощью фазово-контрастной оптики при увеличении ×200 или ×400.
8. Засчитывайте только подвижные сперматозоиды, к которым прикреплены две или более гранул, как описано в разделе **3.7.1.2 на стр. 136**. Оставляйте без внимания связывание, ограниченное кончиком хвоста.
9. Повторите процедуру, используя суспензию иммуногранул IgA.



Примечание. Для обеспечения оценки всех связываний в течение 10 минут лучше всего дифференцировать время подготовки предметных стекол.

Клиническая интерпретация и границы между нормальными и патологическими результатами

В настоящее время не существует основанных на фактических данных референсных пределов для связанных с антителами сперматозоидов, обнаруживаемых в рамках IB-теста эякулята фертильных мужчин. Как и в отношении других клинических диагностических лабораторных исследований, лаборатории должны определить и утвердить свои собственные референсные диапазоны на основе результатов исследований мужчин с нормальными параметрами эякулята и доказанной способностью к оплодотворению.



Согласно предыдущим изданиям руководства диагноз иммунологического бесплодия ставился в тех случаях, когда 50% или более подвижных сперматозоидов (прогрессивных и непрогрессивных) имели прикрепленные частицы, однако предложенный пороговый уровень был установлен на основании результатов небольшого исследования (238). В этой связи следует проявлять осторожность при интерпретации конкретного результата в качестве причины субфертильности. Связывание частиц, ограниченное кончиком хвоста, не ассоциируется с нарушением фертильности и может присутствовать у фертильных мужчин. (235).

3.7.2.2 Косвенный иммуногранулотест

Косвенный IB-тест проводится для обнаружения АСАТ в термоинактивированных жидкостях, не содержащих сперматозоидов (сыворотке крови, тестикулярной жидкости, семенной плазме или солюбилизированной бромелайном цервикальной слизи). В ходе этого исследования биологическая жидкость, не содержащая сперматозоидов, инкубируется с отмытыми сперматозоидами донора, чтобы присутствующие в ней АСАТ связались со сперматозоидами. Сперматозоиды донора без антител поглощают АСАТ, присутствующие в исследуемой жидкости, а затем оцениваются как в прямом IB-тесте.

Реагенты

См. раздел **Реагенты для прямого IB-теста на стр. 137.**

Если необходимо исследовать цервикальную слизь, приготовьте 10 МЕ/мл бромелайна, протеолитического фермента с широкой специфичностью (ЕС 3.4.22.32).

Подготовка иммуногранул

См. раздел **Подготовка иммуногранул на стр. 138.**

Подготовка донорских сперматозоидов

См. раздел **Подготовка сперматозоидов на стр. 138.**

Подготовка материала пациента для исследования

1. При исследовании цервикальной слизи разведите ее 1+1 (1 : 2) 10 МЕ/мл бромелайна, перемешайте наконечником пипетки и инкубируйте при 37°C в течение 10 минут. По завершении разжижения центрифугируйте при 2000g в течение 10 минут. Используйте супернатант сразу же для исследования или заморозьте его при -70°C.
2. Инактивируйте любые комплементы в солюбилизированной цервикальной слизи, сыворотке крови, семенной плазме или тестикулярной жидкости путем нагревания при 56°C в течение 30–45 минут.
3. Разведите термоинактивированный образец 1+4 (1 : 5) буферным раствором 2 (например, 10 мкл исследуемой биологической жидкости разведите 40 мкл буферного раствора 2).
4. Включите в каждый косвенный тест в качестве контроля известные положительные и отрицательные образцы, например, сыворотку крови мужчин с АСАТ и без АСАТ соответственно, выявленные в рамках косвенного IB-теста. Мужчины, прошедшие вазэктомию, могут быть источником сыворотки

крови в случае положительного результата (более 50% сперматозоидов со связыванием гранул, исключая связывание, ограниченное кончиком хвоста).

Инкубация донорских сперматозоидов с исследуемым материалом

1. Смешайте 50 мкл суспензии отмытых донорских сперматозоидов с 50 мкл разведенной 1+4 (1 : 5) жидкости для исследования.
2. Инкубируйте при 37°C в течение 1 часа.
3. Центрифугируйте при 500g в течение 5–10 минут.
4. Слейте и удалите супернатант.
5. Аккуратно ресуспендируйте осадок сперматозоидов в 10 мл свежего буферного раствора 1.
6. Центрифугируйте снова при 500g в течение 5–10 минут.
7. Слейте и удалите супернатант.
8. Повторите вышеуказанные этапы отмытки 5, 6 и 7.
9. Аккуратно ресуспендируйте гранулы сперматозоидов в 0,2 мл буферного раствора 2.

Процедура

1. Проведите IB-тест с инкубированными сперматозоидами донора в соответствии с описанием на **стр. 139**.
2. Проведите оценку и интерпретируйте результаты теста в соответствии с описанием на **стр. 139-140**.

3.8 Биохимические анализы функции добавочных половых желез

Семенная жидкость ненадлежащего качества может быть результатом аномальных секретов добавочных половых желез. Для оценки функции добавочных желез можно измерять концентрацию их секретов, таких как лимонная кислота, цинк, глутамилтранспептидаза и кислая фосфатаза для предстательной железы; фруктоза и простагландины для семенных пузырьков; свободный L-карнитин, глицерофосфохолин (ГФХ) и нейтральная α -гликозидаза для придатка яичка.

Инфекция в любой из этих желез иногда может вызывать временное снижение секреции этих маркеров. Инфекция может также приводить к необратимому повреждению секреторного эпителия, так что даже после острой инфекции секреция может оставаться низкой (239, 240).

- Секреторная способность предстательной железы. Уровни концентрации цинка, лимонной кислоты (241) или кислой фосфатазы (242) в семенной жидкости являются надежными показателями секреции предстательной железы, и между этими маркерами существует хорошая корреляция. Спектрофотометрический метод измерения концентрации цинка описан в **разделе 3.8.1 на стр. 142**.



- Секреторная способность семенных пузырьков. Концентрация фруктозы в семенной жидкости отражает секреторную функцию семенных пузырьков. Спектрофотометрический метод оценки ее концентрации описан в **разделе 3.8.2 на стр. 146**.
- Секреторная способность придатка яичка. Маркерами функции придатка яичка, используемыми в клинической практике, являются уровни L-карнитина, ГФХ и нейтральной α -гликозидазы. Нейтральная α -гликозидаза является более специфичным и чувствительным маркером нарушений функции придатка яичка, чем L-карнитин и ГФХ (240). В эякуляте присутствуют две изоформы α -гликозидазы: основная, нейтральная, форма секретируется исключительно в придатке яичка, а второстепенная, кислая, форма – главным образом в предстательной железе. Простой спектрофотометрический метод определения концентрации нейтральной α -гликозидазы описан в **разделе 3.8.3 на стр. 149**.

3.8.1 Измерение концентрации цинка в эякуляте

3.8.1.1 Справочная информация

Наборы для измерения уровней цинка могут быть в продаже. Удобный метод оценки следов цинка в различных жидкостях детально изложен здесь (243). Он может быть адаптирован для семенной жидкости подобно тому, как доступный ранее коммерческий набор для проведения анализов (244) был модифицирован в целях использования 96-луночного планшет-ридера с чувствительностью 4 мкмоль/л (245). Объемы эякулята и реагентов могут быть пропорционально скорректированы для спектрофотометров, использующих кюветы объемом 3 мл или 1 мл. При расчете результатов необходимо сделать соответствующие поправки.

3.8.1.2 Принцип

Соединение 2-(5-бром-2-пиридилазо)-5-(N-пропил-N-сульфопропиламино)-фенол (5-Br-PAPS) связывается с цинком, вызывая изменение цвета.

$5\text{-Br-PAPS} + \text{Zn}^{2+} \rightarrow$ комплекс 5-Br-PAPS-Zn, который поглощает свет при максимальной длине волны 552 нм.

3.8.1.3 Реагенты

- Исходные растворы:
 - бидистиллированная H_2O для каждой нижеуказанной серии (всего требуется 400 мл);
 - карбонатно-бикарбонатный буферный раствор, pH 9,8, 200 ммоль/л:
 - например, Sigma-Aldrich C3041: растворите 13 капсул в 325 мл очищенной воды.
 - Убедитесь, что pH составляет 9,8.
 - Храните при температуре +4°C; срок годности не менее 3 месяцев;

- 5-Br-PAPS, 0,7 ммоль/л:
 - например, Sigma-Aldrich 180017 (M_w 537,3): 19 мг в 50 мл карбонатно-бикарбонатного буферного раствора.
 - Храните при температуре +4°C; срок годности не менее 3 месяцев;
- цитрат натрия, 850 ммоль/л:
 - например, Sigma-Aldrich C3674 (M_w 258,1): 11,0 г в 50 мл карбонатно-бикарбонатного буферного раствора.
 - Храните при температуре +4°C; срок годности не менее 3 месяцев;
- дефероксамина мезилат, 205 ммоль/л:
 - например, Sigma-Aldrich D9533 (M_w 65658): 96 мг в 60 мл карбонатно-бикарбонатного буферного раствора.
 - Храните при температуре +4°C; срок годности не менее 3 месяцев;
- салицилальдоксим, 29 ммоль/л:
 - например, Sigma-Aldrich 84172 (M_w 137,1): 239 мг в 60 мл очищенной воды.
 - Храните при температуре +4°C; срок годности не менее 3 месяцев.
- Стандартный раствор цинка (50 мкмоль/л).
 - Приготовление:
 - растворите 0,288 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ в 100 мл очищенной воды (концентрация цинка 10 ммоль/л);
 - разведите этот раствор 200× (добавьте 0,5 мл к 99,5 мл очищенной воды), чтобы получить 50 мкмоль/л исходного раствора;
 - тщательно перемешайте и храните замороженным в аликвотах по 2 мл в герметичных пробирках при -20°C до 1 года.
 - Разведение стандартного образца: разведите стандартный раствор цинка 50 мкмоль/л очищенной водой, чтобы получить четыре дополнительных стандартных раствора 40, 20, 10 и 5 мкмоль/л.

Таблица 3.5 Рекомендуемые стандартные растворы для оценки концентрации цинка

Стандартный раствор	Соответствует ⁸ концентрации цинка в семенной жидкости (в мМ)	Стандартный раствор цинка 50 мкмоль/л (в мл)	Очищенная вода (в мл)
40 мкмоль/л	8	0,8	0,2
20 мкмоль/л	4	0,4	0,6
10 мкмоль/л	2	0,2	0,8
5 мкмоль/л	1	0,1	0,9
0 мкмоль/л	0	0	1,0

⁸ Коэффициент разведения ×200, как описано в разделе 3.9.1. Из приблизительно 45 000 образцов эякулята более чем в 99,5% концентрация цинка составляла менее 8 мМ (246. Björndahl L. Prevalence of high zinc concentrations in 45,000 ejaculates - Unpublished data. 2021.).

- Рабочие растворы (приготовленные в день проведения анализа):
 - раствор А. Для приготовления смешать:
 - карбонатно-бикарбонатный буферный раствор, 7,0 мл;
 - исходный раствор 5-Br-PAPS, 4,0 мл;
 - исходный раствор цитрата натрия, 4,0 мл;
 - исходный раствор дефероксамина мезилата, 5,0 мл.
 - Окончательный рабочий раствор. Для приготовления смешать:
 - раствор А, 20 мл;
 - салицилальдоксим, 5 мл.
 - Срок годности 1 неделя при температуре +4–8°C.
- Замороженные пулы семенной плазмы для внутреннего контроля качества: см. **раздел 3.8.4 на стр. 153**.

3.8.1.4 Процедура

Этапы 1–3 предпочтительно выполнять вместе с оценкой уровней фруктозы (**раздел 3.8.2 на стр. 146**) и α -гликозидазы (**раздел 3.8.3 на стр. 149**); разведение 1 на этапе 4 также предпочтительно выполнять вместе с оценкой уровней фруктозы.

1. Центрифугируйте образец эякулята, оставшийся после его исследования, в течение 10–15 минут при 3000g, слейте свободную от сперматозоидов семенную плазму и храните ее при –20°C до проведения анализа.
2. Разморозьте семенную плазму без сперматозоидов. Разморозьте также аликвоту объединенной семенной плазмы для внутреннего контроля качества (**раздел 3.8.4 на стр. 153**).
3. Тщательно перемешайте образцы семенной плазмы вихревым миксером.
4. Процедура разведения. Для разведения неразведенной семенной жидкости необходимо использовать пипетку с прямым вытеснением, позволяющую получить правильный объем семенной жидкости. В целом, подходит разведение 1 : 200. Описываемая здесь двухэтапная процедура упрощает весь биохимический анализ, поскольку разведения, используемые на первом этапе, могут быть также использованы для определения уровней фруктозы.
 - Разведение 1. Разведите 1 : 40 (1+39) каждый образец семенной плазмы: к 975 мкл очищенной H₂O в каждой из двух 1,5-мл пробирок добавьте 25 мкл семенной плазмы (с помощью пипетки с прямым вытеснением) и перемешивайте вихревым способом в течение 5 секунд. Приготовленные разведения могут быть также использованы для оценки уровней фруктозы (**раздел 3.8.2 на стр. 146**) без дополнительного разведения.
 - Разведение 2. Разведите первое разведение 1 : 5 (1+4): к 400 мкл очищенной H₂O добавьте 100 мкл семенной жидкости, разведенной 1 : 40 на этапе 1, описанном выше (конечное разведение 1 : 200). Пипетка с прямым вытеснением на этом этапе не требуется.

5. Поместите 40-мкл аликвоты разведенных на втором этапе образцов семенной жидкости в лунки 96-луночного планшета. Включите аликвоты холостого раствора (40 мкл очищенной воды) и 40-мкл аликвоты каждого из стандартных растворов.
6. Добавьте 200 мкл окрашивающего реактива в каждую лунку и перемешивайте в течение 5 минут на шейкере для 96-луночного планшета.
7. Считывайте планшет при длине волны 552 нм (243).

3.8.1.5 Расчет

1. Вычтите значения фоновой оптической плотности (стандартный раствор 0 мкмоль/л) из значений стандартных растворов и исследуемых и контрольных образцов семенной плазмы.
2. Оцените концентрацию цинка в образце по калибровочной кривой (мкмоль/л), сравнивая значения оптической плотности.
3. Результаты, превышающие верхнюю норму, крайне необычны (246) и не указывают на возможное клиническое расстройство – эти значения могут быть неточными и могут быть представлены как более 8 ммоль/л; повторный анализ обычно не требуется.
4. Умножьте полученные результаты на коэффициент разведения 200, чтобы получить концентрацию цинка (ммоль/л) в неразведенной семенной плазме.
5. Для каждого образца эякулята рассчитывается среднее значение двух препаратов:
 - Для результатов, превышающих 1,5 ммоль/л, значения должны различаться в пределах 10%, то есть разница между оценками/среднее значение оценок не должна превышать 10%. В противном случае повторите анализ на двух новых аликвотах эякулята.
 - При результатах, не превышающих 1,5 ммоль/л, необходимо оценивать любое различие более чем на 0,1 ммоль/л, с тем чтобы определить, указывает ли ошибка при анализе того или иного препарата на возможность диагностической ошибки или же это различие не имеет клинического значения. Если имеет, повторите анализ на двух новых аликвотах эякулята.
6. Умножьте концентрацию на объем эякулята (мл), чтобы получить общее содержание цинка (мкмоль) в эякуляте.

3.8.1.6 Нижний референсный предел

Нижний референсный предел для концентрации цинка составляет 2,4 мкмоль на эякулят (245) (и неопубликованные данные Т.Г. Купера).

3.8.2 Измерение уровней концентрации фруктозы в эякуляте

3.8.2.1 Справочная информация

Описанный ниже метод основан на методе Карвонена и Мальма (247), модифицированном для использования с 96-луночным планшет-ридером с чувствительностью 74 мкмоль/л (240). Объемы эякулята и реагентов могут быть пропорционально скорректированы для спектрофотометров, использующих кюветы объемом 3 мл или 1 мл. При расчете результатов необходимо сделать соответствующие поправки. Низкое содержание фруктозы в эякуляте характерно при обструкции на уровне семявыбрасывающего протока, врожденном двустороннем отсутствии семявыносящих протоков (130, 131, 133), частичной ретроградной эякуляции или андрогенной недостаточности.

3.8.2.2 Принцип

Под воздействием тепла и низкого pH фруктоза образует окрашенный комплекс с индолом, который поглощает свет при длине волны 470 нм.

3.8.2.3 Реагенты

Набор для оценки уровней фруктозы в эякуляте имеется в продаже. В качестве альтернативы приготовьте следующие реагенты:

- Депротеинизирующий агент 1 (63 мкмоль/л $ZnSO_4$): растворите 1,8 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ в 100 мл очищенной воды.
- Депротеинизирующий агент 2 (1 моль/л NaOH): растворите 0,4 г NaOH в 100 мл очищенной воды.
- Окрашивающий реактив (индол 2 мкмоль/л в бензоатном консерванте 16 мкмоль/л):
 - растворите 200 мг бензойной кислоты в 90 мл очищенной воды, встряхивая раствор на водяной бане при 60°C;
 - растворите в нем 25 мг индола и доведите раствор до 100 мл с помощью очищенной воды;
 - при наличии признаков твердых частиц в растворе, отфильтруйте (размер пор 0,45 мкм);
 - храните при +4°C.
- Стандартный исходный раствор фруктозы (22,4 ммоль/л):
 - растворите 403 мг D-фруктозы в 100 мл очищенной воды;
 - храните при 4°C или заморозьте (при -20°C) в аликвотах.

- Разведение стандартного образца: разведите стандартный раствор 2,24 ммоль/л очищенной водой, чтобы получить четыре дополнительных стандартных раствора 1,12, 0,56, 0,28 и 0,14 ммоль/л:

Таблица 3.6 Рекомендуемые стандартные растворы для оценки концентрации фруктозы

Стандартный раствор (ммоль/л)	Соответствует ⁹ концентрации фруктозы в семенной жидкости (ммоль/л)	Стандартный раствор фруктозы 22,4 ммоль/л (в мкл)	Очищенная вода (в мкл)
2,24	89,6	100	900
1,12	44,8	50	950
0,56	22,4	25	975
0,28	11,2	12,5	988
0,14	5,6	6,3	994
0,0	0,0	0	1000

- О замороженных пулах семенной плазмы для внутреннего контроля качества см. в **разделе 3.8.4 на стр. 153**.

3.8.2.4 Процедура

Этапы 1–3 процедуры могут быть выполнены вместе с оценкой уровней цинка (**раздел 3.8.1 на стр. 142**) и α -гликозидазы (**раздел 3.8.3 на стр. 149**); этап 4 предпочтительно совмещать с оценкой уровней цинка.

1. Центрифугируйте образец эякулята, оставшийся после его исследования, в течение 10–15 минут при 3000g, слейте свободную от сперматозоидов семенную плазму и храните ее до проведения анализа при -20°C .
 2. Разморозьте семенную плазму без сперматозоидов. Разморозьте также аликвоту объединенной семенной плазмы для внутреннего контроля качества (**раздел 3.8.4 на стр. 153**).
 3. Тщательно перемешайте образцы семенной плазмы вихревым миксером.
 4. Разведение: рекомендуемое разведение составляет 1 : 40. Если этот анализ выполняется вместе с оценкой цинка, дальнейшее разведение для измерения концентрации цинка может быть выполнено на основе начального разведения 1 : 40, необходимого для определения уровней фруктозы.
- Разведите 1 : 40 (1+39) каждый образец семенной плазмы: к 975 мкл очищенной H_2O в каждой из двух 1,5-мл пробирок добавьте 25 мкл семенной плазмы (с помощью пипетки с прямым вытеснением) и перемешивайте вихревым способом в течение 5 секунд.

⁹ Коэффициент разведения $\times 40$, как описано в разделе 3.8.2.4.

5. Депротенинизация: к 200 мкл образца, разведенного 1 : 40, добавьте 50 мкл 63 мкмоль/л $ZnSO_4$ и 50 мкл 0,1 моль/л NaOH и перемешайте. Дайте постоять 15 минут при комнатной температуре, затем центрифугируйте примерно при 8000g в течение 5 минут.
6. Перенесите 100 мкл супернатанта из каждого образца в пробирки. Включите 100-мкл аликвоты каждого стандартного раствора (включая холостые).
7. Добавьте 100 мкл реактива для индола в каждую пробирку и перемешайте.
8. Добавьте 1 мл концентрированной (37% v/v) соляной кислоты (HCl) в каждый образец, накройте самогерметизирующейся гибкой лабораторной пленкой и тщательно перемешайте в вытяжном шкафу.
9. Нагревайте в течение 20 минут при 50°C на водяной бане. Перемешайте и охлаждайте в ледяной воде в течение 15 минут.
10. Аккуратно перенесите 250-мкл аликвоты в 96-луночный планшет в вытяжном шкафу.
11. Герметично закройте 96-луночный планшет клейкой лабораторной пленкой для защиты спектрофотометра от воздействия кислоты.
12. Считывайте планшет при длине волны 470 нм, используя воду в качестве контроля для установки нуля.

3.8.2.5 Расчет

1. Вычтите значения фоновой оптической плотности (стандартный раствор 0 мкмоль/л) из значений стандартных растворов и исследуемых и контрольных образцов семенной плазмы.
2. Оцените концентрацию фруктозы в образце по калибровочной кривой (мкмоль/л), сравнивая значения оптической плотности.
3. Результаты, превышающие верхнюю норму, не указывают на возможное клиническое расстройство – эти значения могут быть неточными и могут быть представлены как более 90 ммоль/л; повторный анализ обычно не требуется.
4. Умножьте результаты, полученные для каждого образца, на коэффициент разведения 40, чтобы получить концентрацию фруктозы (ммоль/л) в неразведенной семенной плазме.
5. Для каждого образца семенной плазмы рассчитывается среднее значение двух препаратов:
 - Для результатов, превышающих 10 ммоль/л, значения должны различаться в пределах 10%, то есть разница между оценками/среднее значение оценок не должна превышать 10%.
 - В противном случае повторите анализ на двух новых аликвотах эякулята.

- При результатах, не превышающих 10 ммоль/л, необходимо оценивать любое различие более чем на 0,5 ммоль/л, с тем чтобы определить, указывает ли ошибка при анализе того или иного препарата на возможность диагностической ошибки или же это различие не имеет клинического значения. Если имеет, повторите анализ на двух новых аликвотах эякулята.
6. Умножьте концентрацию на объем эякулята (мл), чтобы получить общее содержание фруктозы (мкмоль) в эякуляте.

3.8.2.6 Нижний референсный предел

Нижний референсный предел для концентрации фруктозы составляет 13 мкмоль на эякулят (245) (и неопубликованные данные Т.Г. Купера).

3.8.3 Измерение уровней концентрации нейтральной α -гликозидазы в эякуляте

3.8.3.1 Справочная информация

Семенная плазма содержит как нейтральный изофермент α -гликозидазы, который образуется в придатке яичка, так и кислый изофермент, вырабатываемый предстательной железой. Последний может быть избирательно ингибирован додецилсульфатом натрия (SDS) (248), что позволяет измерять уровни нейтральной α -гликозидазы, отражающие функцию придатка яичка. Учет не связанного с гликозидазой распада субстрата с помощью ингибитора кастаноспермина позволяет повысить чувствительность анализа. Описанный ниже метод предназначен для использования с 96-луночным планшет-ридером с чувствительностью 1,9 МЕ/мл (249). Объемы эякулята и реагентов могут быть пропорционально скорректированы для спектрофотометров с кюветами объемом 3 мл или 1 мл. При расчете результатов необходимо сделать соответствующие поправки.

3.8.3.2 Принцип

Гликозидаза превращает синтетический глюкопиранозидный субстрат в п-нитрофенол, который становится желтым (длина волны 405 нм) при добавлении карбоната натрия.

3.8.3.3 Реагенты

Наборы для оценки уровней концентрации вырабатываемой в придатке яичка нейтральной α -гликозидазы в эякуляте имеются в продаже. Для измерения концентрации этого фермента в эякуляте рекомендуется использовать только наборы, включающие SDS и кастаноспермин. В качестве альтернативы приготовьте следующие реагенты:

- Буферный раствор 1 (0,2 моль/л фосфата, pH 6,8):
 - растворите 4,56 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ в 100 мл очищенной воды;

- растворите 2,72 г K_2HPO_4 отдельно в 100 мл очищенной воды;
- смешайте примерно равные объемы каждого из этих растворов до достижения pH 6,8.
- Буферный раствор 2: растворите 1 г SDS в 100 мл буферного раствора 1. SDS выпадает в осадок при хранении при +4°C, но растворяется при осторожном нагревании.
- Окрашивающий реактив 1 (для остановки реакции 0,1 моль/л карбонат натрия): растворите 6,20 г $Na_2CO_3 \cdot H_2O$ в 500 мл H_2O .
- Окрашивающий реактив 2: растворите 0,1 г SDS в 100 мл окрашивающего реактива 1.
- Субстрат п-нитрофенола глюкопиранозид (PNPG) (5 мг/мл): растворите 0,1 г PNPG в 20 мл буферного раствора 2 и нагревайте на плите при температуре около 50°C, перемешивая в течение 10 минут. Несколько кристаллов могут остаться нерастворенными. Во время использования раствор должен храниться при 37°C. Для каждого анализа готовьте свежий раствор.
- Ингибитор гликозидазы для контрольных образцов эякулята (кастаноспермин, 10 ммоль/л):
 - растворите 18,9 мг кастаноспермина в 10 мл очищенной воды;
 - разведите полученный раствор в 10 раз очищенной водой для получения рабочего раствора 1 ммоль/л;
 - заморозьте аликвоты объемом примерно 1 мл при -20°C.
- Приготовление стандартных растворов.
 - Исходный раствор продукта п-нитрофенола (исходный PNP) (5 ммоль/л):
 - растворите 69,5 мг PNP в 100 мл очищенной воды, при необходимости нагревая раствор;
 - храните при +4°C в темноте во флаконе, обернутом алюминиевой фольгой, или во флаконе из коричневого стекла.
 - Готовьте свежий стандартный раствор каждые 3 месяца.
 - Приготовьте рабочий раствор (рабочий стандартный раствор 200 мкмоль/л) для построения калибровочной кривой (в течение последнего часа инкубации): поместите 400 мкл 5 ммоль/л исходного PNP в 10-мл объемную колбу и доведите объем до 10 мл, добавляя окрашивающий реактив 2.
 - Разведите рабочий стандартный раствор 200 мкмоль/л окрашивающим реактивом 2 для получения четырех дополнительных стандартных растворов 160, 120, 80 и 40 мкмоль/л PNP:

Таблица 3.7 Рекомендуемые стандартные растворы для оценки уровней активности α -гликозидазы

Окончательная концентрация PNP	Соответствует уровню активности в эякуляте (мМЕ/мл)	Рабочий раствор 200 мкмоль/л (в мкл)	Окрашивающий реактив 2 (в мкл)
200 мкмоль/л PNP	124	1000	0
160 мкмоль/л PNP	99	800	200
120 мкмоль/л PNP	74	600	400
80 мкмоль/л PNP	50	400	600
40 мкмоль/л PNP	25	200	800
0 мкмоль/л PNP	0	0	1000

- 0 замороженных пулах семенной плазмы для внутреннего контроля качества см. в разделе 3.8.4 на стр. 153.

3.8.3.4 Процедура

Этапы 1–3 могут быть выполнены вместе с оценками уровней цинка (раздел 3.8.1 на стр. 142) и фруктозы (раздел 3.8.2 на стр. 146).

1. Центрифугируйте образец эякулята, оставшийся после его исследования, в течение 10–15 минут при 3000g. Слейте свободную от сперматозоидов семенную плазму и храните до проведения анализа ее при температуре -20°C . Семенная плазма без сперматозоидов может быть объединена с другими образцами с целью получения пула для контроля качества, который может быть использован как внутренний стандарт при проведении будущих анализов.
2. Разморозьте семенную плазму без сперматозоидов и тщательно перемешайте ее вихревым миксером. Разморозьте также аликвоту объединенной семенной плазмы для внутреннего контроля качества.
3. Тщательно перемешайте образцы семенной плазмы вихревым миксером.
4. Поместите 15-мкл аликвоты семенной плазмы в каждую из двух 1,5-мл пробирок с помощью пипетки с прямым вытеснением. Включите холостые растворы (15 мкл воды) и четырехкратные 15-мкл образцы из пулов семенной плазмы для проведения внутреннего контроля качества.
5. К двум образцам для внутреннего контроля качества добавьте 8 мкл 1 ммоль/л кастаноспермина для получения холостого значения семенной плазмы.
6. Добавьте в каждую пробирку 100 мкл раствора субстрата PNPG при температуре около 37°C .
7. Перемешайте каждую пробирку вихревым способом и инкубируйте при 37°C в течение 2 часов (точный контроль температуры и времени крайне важен).

8. Остановите инкубацию через 2 часа, добавив 1 мл окрашивающего реактива 1, и перемешайте.
9. Перенесите 250-мкл аликвоты образцов и стандартных растворов в 96-луночный планшет.
10. Считывайте 96-луночный планшет-ридер при длине волны 405 нм в течение 60 минут, используя воду в качестве контроля для установки нуля.

3.8.3.5 Расчет

1. Оцените концентрацию PNP в образце по калибровочной кривой (мкмоль/л), сравнивая значения оптической плотности.
2. Результаты, превышающие верхнюю норму, не указывают на возможное клиническое расстройство – значения могут быть неточными и могут быть представлены как более 124 мМЕ/мл; повторный анализ обычно не требуется.
3. Умножьте на поправочный коэффициент (0,6194), чтобы получить уровень активности нейтральной гликозидазы в неразведенной семенной плазме (МЕ/л).
4. Вычтите значение активности (МЕ/л) кастаносперминового контрольного раствора семенной плазмы из значения каждого образца, с тем чтобы получить скорректированный (связанный с гликозидазой) уровень активности.
5. Полученные значения должны различаться в пределах 10% (т.е. разница между оценками/среднее значение оценок не должна превышать 10%). Повторите анализ, если два отличающихся значения указывают на разные диагностические результаты.
6. Умножьте скорректированный уровень активности на объем эякулята (мл), чтобы получить гликозидазную активность (mU) эякулята.



Примечание. Одна международная единица (МЕ) гликозидазной активности определяется как выработка 1 мкмоль продукта (PNP) в минуту при 37°C. В данном анализе уровень активности рассчитан на основе инкубации 15 мкл семенной плазмы из общего объема 1,115 мл в течение 120 минут, поэтому поправочный коэффициент будет следующим: $(1115/15)/120 = 0,6194$.

3.8.3.6 Референсные пределы

Нижний референсный предел для нейтральной α -гликозидазы составляет 20 mU/эякулят (245) (и неопубликованные данные Т.Г. Купера). При сравнении 1 262 образцов эякулята без сперматозоидов после вазэктомии и 1 106 образцов эякулята, содержащих более 40 миллионов сперматозоидов, наилучшим пороговым значением было 23,1 mU/эякулят (250). Кроме того, имеются основания полагать, что эякулят после вазэктомии, собранный после длительного эякуляторного воздержания, может иметь высокие значения нейтральной α -гликозидазы, особенно в образцах эякулята с высоким содержанием цинка, что указывает на возможное воздействие α -гликозидазы предстательной железы на результаты анализа (250).



3.8.4 Пулы семенной плазмы для внутреннего контроля качества

Одним из необходимых компонентов биохимической оценки эякулята является систематическое использование образцов для ВКК, который должен проводиться применительно к каждой серии. Свободную от сперматозоидов семенную плазму, полученную после центрифугирования (при 3000g в течение 10–15 минут), следует хранить до проведения оценки при температуре -20°C . Оставшуюся после анализа семенную плазму можно повторно замораживать и один или два раза в год использовать для приготовления большого пула смешанной семенной плазмы, которая после тщательного перемешивания (магнитной мешалкой при комнатной температуре) аликвотируется в объемах, достаточных для проведения серии биохимических анализов. Образцы для КК могут храниться в герметичных пробирках при температуре -20°C до 12 месяцев.

Новая серия пула семенной плазмы используется параллельно с текущими образцами для КК в нескольких препаратах в рамках проведения по меньшей мере трех различных анализов для каждого анализа. Таким образом оценивается вариабельность результатов в пределах одного и разных анализов и определяется общая приемлемая вариабельность новой серии семенной плазмы для КК.

3.9 Оценка последовательности эякуляции

Нормальная последовательность эякуляции имеет физиологическое значение для функции сперматозоидов и их нормальной способности к оплодотворению и эмбриональному развитию. Нормальная последовательность означает, что подавляющее большинство сперматозоидов извергается в первых фракциях эякулята преимущественно вместе с секретом предстательной железы, тогда как в последующих двух третях эякулята преобладает жидкость семенных пузырьков (251, 252). Хорошо известно, что при первичном контакте с богатым цинком секретом предстательной железы подвижность, выживаемость и стабильность хроматина сперматозоидов повышаются, в то время как при первичном контакте со щелочной, связывающей цинк жидкостью семенных пузырьков наблюдается обратная картина (13, 253–257).

Воспалительные процессы в предстательной железе или врожденные пороки развития могут вызвать стеноз (или обструкцию семявыбрасывающего протока – ОСП) в отверстиях семявыбрасывающих протоков, открывающихся в уретру, или рядом с ними (258–265). Последствием стеноза будет задержка поступления сперматозоидов в уретру до тех пор, пока под давлением сокращающихся семенных пузырьков содержимое семявыбрасывающего протока не попадет в уретру. Лабораторным результатом при обычном исследовании эякулята будет, прежде всего, плохая подвижность.

Даже биохимическая оценка всего эякулята не покажет, подвергались ли сперматозоиды аномальному воздействию жидкости семенных пузырьков. Единственным способом диагностировать ОСП путем исследования эякулята является сбор отдельных фракций эякулята и исследование содержания, подвижности и биохимического состава сперматозоидов (секрета предстательной железы и семенных пузырьков соответственно) (13).

Если диагностирована нарушенная последовательность эякуляции, существуют малоинвазивные хирургические методы лечения ОСП (266–272); кроме того, негативное влияние жидкости семенных пузырьков можно



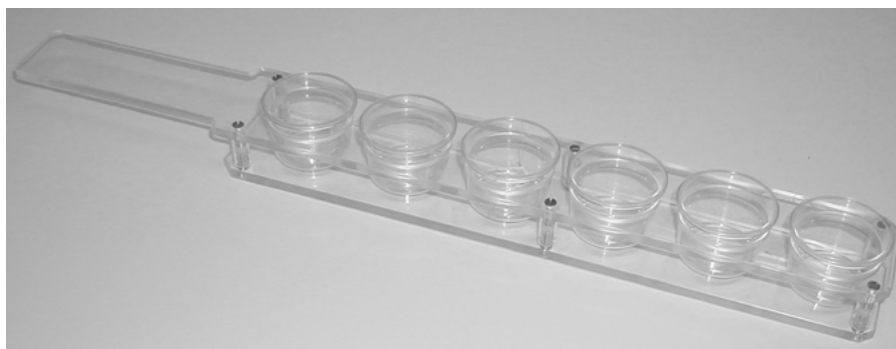
уменьшить, предоставив мужчине возможность собрать весь эякулят непосредственно в среду для отмывки сперматозоидов.

3.9.1 Оборудование – в дополнение к обычному исследованию эякулята

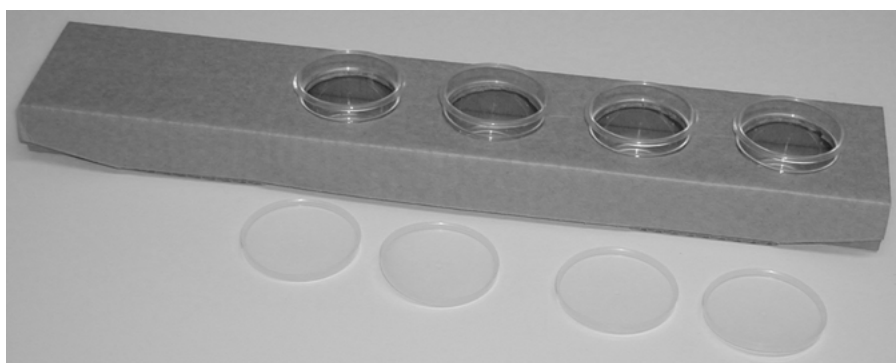
Здесь входит любой набор устройств для сбора эякулята, позволяющий пациенту собрать фракции эякулята в том порядке, в котором они извергаются.

Рис. 3.8 Два примера устройств для сбора разделенного эякулята

А



В



Воспроизведено с разрешения *A Practical Guide to Practical Laboratory Andrology*, Cambridge University Press (273)

3.9.2 Процедуры для пациента

Пациента инструктируют собрать фракции эякулята в том порядке, в котором они будут извергаться, причем этот порядок подтверждается пациентом при предоставлении пробирок в лабораторию. Пробирки должны быть пронумерованы в последовательном порядке в дополнение к их обычной идентификационной маркировке.

3.9.3 Процедуры обработки образцов

Образование преципитата или геля возможно только во фракциях с преобладанием секрета семенных пузырьков. Исследование фракций, в которых преобладает секрет предстательной железы, можно начинать через

5–10 минут после доведения температуры до 37°C (для оценки подвижности). Фракции с преципитатом могут быть растворены в течение 30 минут при 37°C. Фракции, не содержащие протеаз простатического происхождения, могут не разжижаться более длительное время.

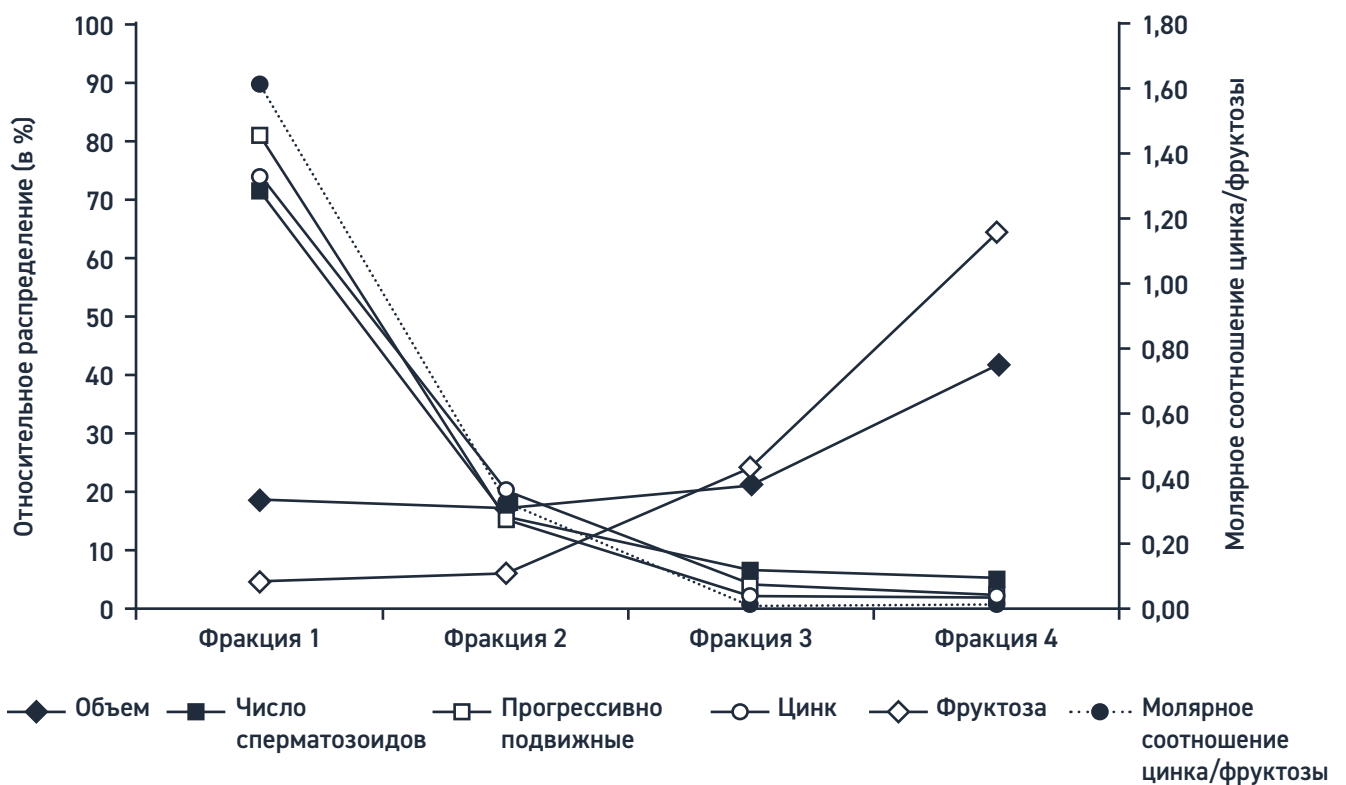
3.9.4 Исследование

Оценка объема, числа сперматозоидов, подвижности, а также уровней цинка (маркер предстательной железы) и фруктозы (маркер семенных пузырьков) проводится в соответствии с обычным исследованием цельного эякулята.

3.9.5 Расчет

Рассчитайте относительное распределение объема, числа сперматозоидов, доли прогрессивно подвижных сперматозоидов и биохимических маркеров. Сначала подсчитайте общее число в каждой фракции, затем относительное распределение в каждой фракции (рис. 3.9).

Рис. 3.9 Пример графического представления результатов исследования нормального четырехфракционного разделенного эякулята, демонстрирующий распределение таких показателей, как объем, число сперматозоидов, прогрессивная подвижность и уровни цинка и фруктозы



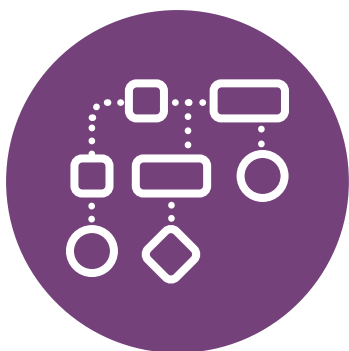
Воспроизведено с разрешения *A Practical Guide to Practical Laboratory Andrology*, Cambridge University Press (273)

3.9.6 Интерпретация

Основная масса сперматозоидов, как ожидается, находится в первой трети эякулята, где преобладает богатый цинком секрет предстательной железы. Поступление значительного количества жидкости семенных пузырьков в богатую сперматозоидами фракцию (фракции) указывает на нефизиологическую ситуацию, которая может подавлять функциональную способность сперматозоидов.

Выявление фракции эякулята с хорошей прогрессивной подвижностью может быть полезным для будущего отбора сперматозоидов для ВРТ, что было описано задолго до наступления эпохи ЭКО (274).

Кроме того, для лабораторий, не имеющих возможности определять такие маркеры функции добавочных желез, как концентрация цинка и фруктозы, полезная информация может быть получена путем оценки относительного распределения сперматозоидов и прогрессивной подвижности, с тем чтобы определить возможные источники сперматозоидов с более высокой вероятностью успешного оплодотворения.



Глава 4. Углубленные исследования

4.1 Исследования оксидативного стресса сперматозоидов и активных форм кислорода	158
4.2 Оценка акросомной реакции	162
4.3 Оценка хроматина сперматозоидов.....	168
4.4 Трансмембранный поток и перенос ионов в сперматозоидах.....	173
4.5 Компьютерный анализ эякулята (CASA)	175
4.6 Новые технологии	180

Мужское бесплодие часто связано с недостаточной выработкой семенной жидкости, аномальной морфологией сперматозоидов, нарушением подвижности сперматозоидов или сочетанием этих причин. Такие фенотипы можно с точностью определить в рамках исследования эякулята. Вместе с тем у многих пациентов параметры эякулята, полученные в результате его исследования, представляются совершенно нормальными, и их бесплодие, скорее всего, связано с нарушением функции сперматозоидов. Механизмы, лежащие в основе нарушения функции сперматозоидов человека, остаются неизвестными. Сперматозоиды человека должны выполнить ряд сложных задач внутри женских половых путей, преодолевая расстояния в несколько сантиметров, прежде чем они получают химические и физические сигналы в отношении локализации яйцеклетки. Кроме того, сперматозоиды должны пройти стадии акросомального экзоцитоза и гиперактивированной подвижности для того, чтобы преодолеть защитные оболочки яйцеклетки. Большинство из этих навыков сперматозоиды приобретают только внутри женских половых путей в процессе созревания, называемого капациацией. И хотя эти функции сперматозоидов необходимы для оплодотворения, ни одна из них не оценивается в рамках классического исследования эякулята.

“

Для более глубокого понимания биологических основ мужского фактора бесплодия был разработан целый ряд функциональных тестов, направленных на оценку способности сперматозоидов человека выполнять фундаментальные процессы, необходимые для зачатия.

”



Для устранения этого диагностического пробела необходимо передать знания о молекулярной и клеточной физиологии сперматозоидов в клиники. Кроме того, с учетом последних публикаций, свидетельствующих о том, что изменения параметров эякулята могут быть связаны с общим состоянием здоровья человека, проведение исследований в области мужского бесплодия имеет в настоящее время фундаментальное значение (275). Более того, в настоящее время имеются фактические данные о том, что загрязнители окружающей среды в значительной мере причастны к мужскому бесплодию (276), а также к документально подтвержденному уменьшению количества сперматозоидов, наблюдаемому на протяжении последних десятилетий (277). Меньше известно о том, являются ли функции сперматозоидов, необходимые для оплодотворения, зеркалом общего состояния здоровья и влияют ли на них загрязнители окружающей среды. По мере накопления знаний о молекулярных механизмах, регулирующих функцию сперматозоидов, расширяются возможности для разработки новых диагностических тестов. Так, например, последние данные свидетельствуют о важности уплотнения ядерной ДНК и ее целостности для определения функциональной компетентности сперматозоидов человека. Появляются данные, свидетельствующие о связях целостности ДНК и организации хроматина в сперматозоидах с фертильностью (278) (**раздел 3.2 на стр. 97**).

Аналогичным образом улучшенное понимание путей сигнальной трансдукции, регулирующей функцию сперматозоидов, позволит разработать диагностические тесты для получения детальной информации о точной природе процессов, нарушенных в сперматозоидах бесплодных мужчин. Для более глубокого понимания биологических основ мужского фактора бесплодия был разработан целый ряд функциональных тестов, направленных на оценку способности сперматозоидов человека выполнять фундаментальные процессы, необходимые для зачатия, такие как связывание с блестящей оболочкой, акросомальный экзоцитоз и слияние с вителлиновой мембраной ооцита.

Для некоторых тестов, проводимых в исследовательских целях, требуется отделение/отбор сперматозоидов из семенной жидкости. Такие процедуры должны проводиться как можно быстрее и не позднее чем в течение 1 часа после эякуляции, с тем чтобы ограничить любое повреждение сперматозоидов клетками, не относящимися к сперматозоидам. Кроме того, следует помнить, что классический способ сбора всего эякулята в один контейнер для образца приводит к тому, что исследуются сперматозоиды, подвергшиеся воздействию нефизиологических сред, например жидкости семенных пузырьков (251, 252) (см. также **раздел 3.9 на стр. 153**).

4.1 Исследования оксидативного стресса сперматозоидов и активных форм кислорода

4.1.1 Справочная информация

На протяжении нескольких десятилетий выдвигается гипотеза о том, что дисбаланс окислительно-восстановительных реакций (REDOX) в мужских половых путях или секретах половых желез может оказывать пагубное воздействие на фертильность (279–283). Принято считать, что в основе такого пагубного воздействия лежат вырабатываемые лейкоцитами активные формы кислорода (АФК), если они присутствуют в больших количествах в семенной жидкости (**раздел 3.4 на стр. 121**). Вместе с тем пока еще не



было проведено каких-либо знаковых исследований, которые позволили бы получить убедительные аргументы в пользу того или иного теста или доказать взаимосвязь между окислительно-восстановительным балансом и результатами естественного или искусственного оплодотворения. Вместе с тем считается, что, по всей вероятности, оксидативный стресс является важным модулятором функции сперматозоидов человека и результатов оплодотворения (284). Поскольку одним из последствий оксидативного стресса является повреждение ДНК сперматозоидов (**раздел 3.2 на стр. 97**), чаще всего оценивается именно это последствие, однако существует несколько других методов исследования, которые можно использовать для более непосредственного изучения баланса между антиоксидантами и АФК. С точки зрения клинической диагностики эту группу исследований следует использовать и интерпретировать с осторожностью до тех пор, пока не появятся более убедительные доказательства их диагностической значимости. Представленные здесь процедуры широко используются в андрологических исследованиях, а также в некоторых андрологических клинико-диагностических лабораториях и лабораториях вспомогательной репродукции. Исследования, которые могут быть использованы для оценки окислительно-восстановительного баланса или АФК, различаются как по методу, так и по типу выявляемых АФК.

4.1.2 Люминол

Этот метод основан на хемилюминесценции люминола в ходе его реакции со свободными радикалами. Уровень хемилюминесценции можно измерить с помощью люминометрии, а затем рассчитать количество относительных световых единиц (ОСЕ) на миллион сперматозоидов.

4.1.2.1 Процедура

Адаптировано из документа Диас (285):

1. Приготовьте 100 мМ исходного раствора люминола (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона), отмерив 177,1 мг люминола в полистироловую пробирку с 10 мл диметилсульфоксида (ДМСО). Заверните пробирку в алюминиевую фольгу, поскольку этот раствор чувствителен к свету. Раствор остается стабильным при комнатной температуре, но может храниться и в холодильнике.
2. Рабочие «зондовые» растворы: приготовьте 5 мМ раствора люминола в ДМСО путем разведения 20 мкл исходного раствора люминола в 380 мкл ДМСО. Этот раствор следует приготовить непосредственно перед использованием (он остается стабильным только в течение 24 часов). Раствор должен быть защищен от света.
3. Перед измерением необходимо подождать, пока эякулят станет жидким (в пределах 30 минут, но не более 1 часа в соответствии с основными методами исследования эякулята ВОЗ).
4. При использовании люминометрии измерения должны проводиться в двух препаратах (как абсолютный минимум).



- Для каждого эякулята готовится одна пробирка путем смешивания 390 мкл эякулята с 10 мкл рабочего «зондового» раствора. Перемешайте вихревым способом в течение 5 секунд, а затем аликвотируйте как минимум в две пробирки (или лунки в планшете).

5. Все наборы для исследования должны включать:

- холостой раствор **DPBS** или только среду;
- отрицательный контроль: 390 мкл DPBS или среды + 10 мкл «зондового» раствора;
- положительный контроль (в обоих случаях с добавлением 50 мкл перекиси водорода (30%-ной) + 10 мкл «зондового» раствора):
 - эякулят (340 мкл) или
 - DPBS или среда (340 мкл).

6. Данные следует регистрировать по ряду показаний с одинаковым интервалом и в порядке следования каждого анализа в соответствии с типом прибора; затем повторите и рассчитайте среднее значение.

7. Положительный контроль можно использовать для оценки чувствительности исследования в конкретных условиях с помощью серии разведений, а также для подтверждения того, что при использовании любого конкретного набора для исследования будет обнаружен значимый результат.

8. Для нормализации данных среднее значение для образца вычитается из среднего отрицательного контроля. Этот показатель может быть скорректирован на количество сперматозоидов путем деления на концентрацию сперматозоидов в миллионах на мл, но на сегодняшний день неясно, имеют ли результаты, скорректированные на количество сперматозоидов, большую значимость, чем результаты, полученные в отношении образца, и поэтому можно указывать оба результата.

4.1.2.2 Проблемы

- Люминометры, как правило, не аккредитованы для диагностики *in vitro* и предназначены только для исследований.
- Конструкция приборов (например в том, что касается объема образца) и, соответственно, калибровка, чувствительность, динамический диапазон и даже используемые единицы измерения значительно различаются.
- Из-за описанных различий между приборами и методологиями и низкой прогностической ценности исследований согласованных референсных значений не существует.
- Силы сдвига (перемешивание) изменяют сигнал, поэтому результаты крайне чувствительны к манипуляциям во время обращения с образцами и ко времени проведения измерения.

- Люминол чувствителен к pH, перепадам температуры и воздействию химических веществ, часто варьирующихся в разных эякулятах, таких как аскорбиновая кислота (ослабляет сигнал) или тиол-содержащие молекулы (повышают результаты), а также к уровням других присутствующих белков.

4.1.3 Окислительно-восстановительный потенциал

В основе этого метода лежит непосредственное измерение окислительно-восстановительного баланса в образцах электрохимическими способами. В качестве интегрирующего измерения комбинированного образца, для которого требуются минимальные манипуляции и которое в этой связи вполне поддается стандартизации, этот метод в настоящее время широко используется в рамках исследований субфертильности. На данный момент в продаже можно найти только один прибор, имеющий патентную защиту. В нем используются одноразовые датчики для измерения. Этот прибор следует использовать в соответствии с последними протоколами производителя, которые не рассматриваются в данном руководстве.

4.1.3.1 Проблемы

- Убедительных фактических данных в пользу этого исследования не опубликовано; в настоящее время его следует продолжать рассматривать как исследовательский тест до тех пор, пока не появятся убедительные данные, касающиеся репродуктивных исходов.
- Вязкость образца и плохое разжижение могут сказаться на его текучести и, следовательно, затруднить заполнение эталонной камеры.
- Как и для всех других исследований сперматозоидов, время для проведения этого исследования после эякуляции должно быть стандартизировано.

4.1.4 Общая антиоксидантная способность

Этот метод предназначен для оценки способности всего эякулята уравновешивать любой оксидативный стресс. Таким образом измеряется способность антиоксидантных ферментов и систем в семенной плазме, а также любых антиоксидантов, попавших в семенную плазму из пищи или иным способом (но не в сперматозоиды; они удаляются центрифугированием). В этом исследовании присутствующие антиоксиданты ингибируют окисление 2'-азинобис-(3-этилбензтиазолинсульфонокислоты) (АБТС) катионами-радикалами. Этот тест был разработан для использования применительно к разным жидкостям организма и поэтому не является специфическим для эякулята (286). Для создания стандартного диапазона используется тролокс, аналог витамина Е (токоферола), поэтому результаты исследования обычно выражаются в микромолях тролокс-эквивалента.

4.1.4.1 Процедура

1. Ввиду широкого использования этого исследования во многих системах помимо фертильности для его проведения доступны готовые наборы от



ряда поставщиков. Необходимо следовать инструкциям к соответствующим наборам. Можно также составить наборы из отдельно закупленных ингредиентов.

2. Следует дождаться полного разжижения эякулята, а затем центрифугировать его при более 1000g в течение 15 минут. Затем можно удалить прозрачную семенную плазму. 10 мкл этой плазмы можно проверить, с тем чтобы убедиться в отсутствии сперматозоидов. Если сперматозоиды присутствуют, повторите центрифугирование.
3. Чистая семенная плазма может быть аликвотирована и непосредственно заморожена для последующего исследования. Это может быть полезным при проведении серии исследований. Стабильность результатов при любой заданной температуре замораживания должна быть проверена и подтверждена лабораторией, выполняющей исследование.
4. При подготовке к измерениям в рамках исследования все ингредиенты должны быть заранее доведены до комнатной температуры. Все используемые компоненты чувствительны к свету, поэтому во время подготовки и проведения исследования следует максимально уменьшить воздействие света, например выключить лабораторное освещение.
5. Измерения должны проводиться в двух препаратах (как абсолютный минимум). Абсорбция считывается при 750 нм.

4.1.4.2 Проблемы

- Опубликовано значительное количество убедительных данных о процедуре исследования и агентах, которые могут влиять на результаты в разных системах (287), но с точки зрения использования этого исследования для составления медицинского заключения о параметрах эякулята и влиянии АФК на фертильность его следует продолжать рассматривать как исследовательский тест до тех пор, пока не появятся убедительные данные, касающиеся репродуктивных исходов.
- Из-за различий между приборами и методологиями и низкой прогностической ценности данных научно обоснованных референсных значений не существует.
- В идеале результаты исследования следует считывать на микропланшетном ридере из-за большого количества дублирующих тестов и стандартов.

4.2 Оценка акросомной реакции

4.2.1 Справочная информация

Для нормальной фертильности необходимы целостность структуры акросомы и способность к акросомальному экзоцитозу. Акросомная реакция – это процесс, который *in vivo* происходит в непосредственной близости от ооцита в преддверии проникновения сперматозоида через оболочку ооцита и слияния с



ним. Считается, что инициирующим событием в нормальной акросомной реакции является приток кальция. В случаях тератозооспермии и олигозооспермии у некоторых пациентов, которые в остальном могут иметь нормальные результаты исследования эякулята, сперматозоиды могут демонстрировать изменения в структуре акросомы или в способности реагировать на стимулы акросомной реакции (288).

Известно несколько стимулов, вызывающих акросомную реакцию. В их число входят белки блестящей оболочки (289) и прогестерон (290), которые считаются возможными физиологическими индукторами акросомной реакции ввиду их повышенной концентрации вблизи ооцита. Акросомную реакцию вызывают и другие стимулы, такие как кальций-ионофоры, но полученные результаты не соотносятся или в меньшей степени соотносятся с результатами, полученными при акросомной реакции, индуцируемой блестящей оболочкой (291). Недавний мета-анализ (288) продемонстрировал значительную корреляцию процентной доли сперматозоидов, вступающих в индуцированную стимулами акросомную реакцию, с частотой оплодотворения. Акросомный статус после индукции акросомной реакции можно оценить с помощью микроскопии или проточной цитометрии (292) с использованием флуоресцентно меченных лектинов, таких как *Pisum sativum* (гороховый агглютинин) (раздел 4.4.1 на стр. 173) или *Arachis hypogaea* (арахисовый лектин), или моноклональных антител к акросомному антигену CD46 (293). Индукция притока кальция путем использования индукторов акросомной реакции является одним из способов проверки способности капацированных сперматозоидов к акросомной реакции (294, 295). Вместе с тем, прежде чем исследование акросомного статуса можно будет считать рутинным клиническим исследованием, необходимо провести его дальнейшую валидацию и оценку.

Ниже описаны процедуры статической оценки акросомного статуса и динамической индуцированной акросомной реакции.

4.2.2 Оценка акросомного статуса

4.2.2.1 Процедура

Этот метод был первоначально разработан Кроссом (296) на основе исследования Мортимера и др. (297), в котором было продемонстрировано, что агглютинин *Arachis hypogaea* (арахиса) (FITC-PNA) связывается с наружной мембраной акросомы сперматозоида. Впоследствии метод был модифицирован Айткеном (294), который ввел реагент гипоосмотического набухания (раздел 2.5.13.2 на стр. 78) для оценки акросомной реакции только в живых сперматозоидах. Эта простая и воспроизводимая процедура позволяет получить очень четкие изображения (рис. 4.1 на стр. 166). Предпочтительно использовать препарат сперматозоидов с высокой подвижностью, свободный от таких загрязнений, как лейкоциты, половые клетки и мертвые сперматозоиды. Таким образом, в зависимости от качества образца и протокола исследования необходимо либо отмыть образец (раздел 5.3 на стр. 186), либо подготовить препараты с использованием метода всплытия (swim-up) или путем центрифугирования в градиенте плотности (раздел 5.4 на стр. 187 и раздел 5.5 на стр. 188).

4.2.2.2 Реагенты

- Агглютинин *Pisum sativum* (PSA), меченный изотиоцианатом флуоресцеина (FITC) (PSA-FITC);
- Агглютинин *Arachis hypogaea* (арахиса), меченный изотиоцианатом флуоресцеина (FITC) (AHLFNA-FITC);
- **DPBS**, pH 7,4;
- 0,9%-ный (9 г/л) NaCl: растворить 0,9 г NaCl в 100 мл очищенной воды;
- 95%-ный (v/v) этанол;
- Исходный раствор PSA и AHLFNA: разведите 2 мг PSA-FITC или AHLFNA-FITC в 4 мл DPBS и храните в аликвотах по 0,5 мл при – 20°C;
- Рабочий раствор PSA: разведите 0,5 мл исходного раствора PSA в 10 мл DPBS и храните при 4°C. Этот раствор остается стабильным в течение 4 недель.

4.2.2.3 Простое отмывание сперматозоидов

1. Тщательно перемешайте образец эякулята и отберите аликвоту объемом около 0,2 мл.
2. Разведите до 10 мл 0,9%-ным (9 г/л) солевым раствором.
3. Центрифугируйте при 800g в течение 10 минут.
4. Удалите супернатант, оставив 20–40 мкл.
5. Ресуспендируйте осадок сперматозоидов в оставленном супернатанте аккуратным пипетированием.
6. Повторите процедуру отмывания.

4.2.2.4 Обработка очищенных препаратов эякулята

1. Разведите препараты, подготовленные методом всплытия (**раздел 5.4 на стр. 187**) или однократно отмыемые посредством центрифугирования в градиенте плотности (**раздел 5.5 на стр. 188**), до 10 мл буферным раствором для получения концентрации 10 млн/мл.
2. Центрифугируйте при 800g в течение 10 минут.
3. Удалите супернатант, оставив 20–40 мкл.
4. Ресуспендируйте осадок сперматозоидов в буферном растворе для гипоосмотического набухания в течение 30 минут.
5. Центрифугируйте при 800g в течение 10 минут.

- Удалите супернатант и ресуспендируйте в небольшом объеме буферного раствора аккуратным пипетированием.

4.2.2.5 Приготовление мазков

- Сделайте несколько мазков длиной около 1 см из примерно 5 мкл суспензии сперматозоидов.
- Изучите влажные мазки под фазово-контрастным микроскопом ($\times 400$).
- Убедитесь, что сперматозоиды распределены на предметных стеклах равномерно и без наслоений.
- Высушите на воздухе.
- Фиксируйте в 95%-ном (v/v) этаноле в течение 30 минут.
- Высушите на воздухе.

4.2.2.6 Окрашивание PSA-FITC

- Налейте 10 мл рабочего раствора PSA-FITC или AHLpNA-FITC в вертикальный сосуд для окрашивания.
- Погрузите зафиксированные и высушенные на воздухе предметные стекла в краситель PSA-FITC.
- Оставьте окрашиваться более чем на 1 час при 4°C. Более длительное время окрашивания – до 18 часов – не влияет на результаты. Окрашивание в течение более короткого времени – менее 1 часа – затруднит оценку предметных стекол.
- Промойте каждое предметное стекло очищенной водой и заключите их в водорастворимую среду (**раздел 2.4.9.5 на стр. 56**).

4.2.2.7 Оценка

Рассмотрите предметное стекло с помощью флуоресцентной оптики при увеличении $\times 1000$ с масляной иммерсией при длине волны возбуждения 450–490 нм и с комбинацией дихроичных фильтров, подходящей для наблюдения пиковой длины волны эмиссии в 519 нм.

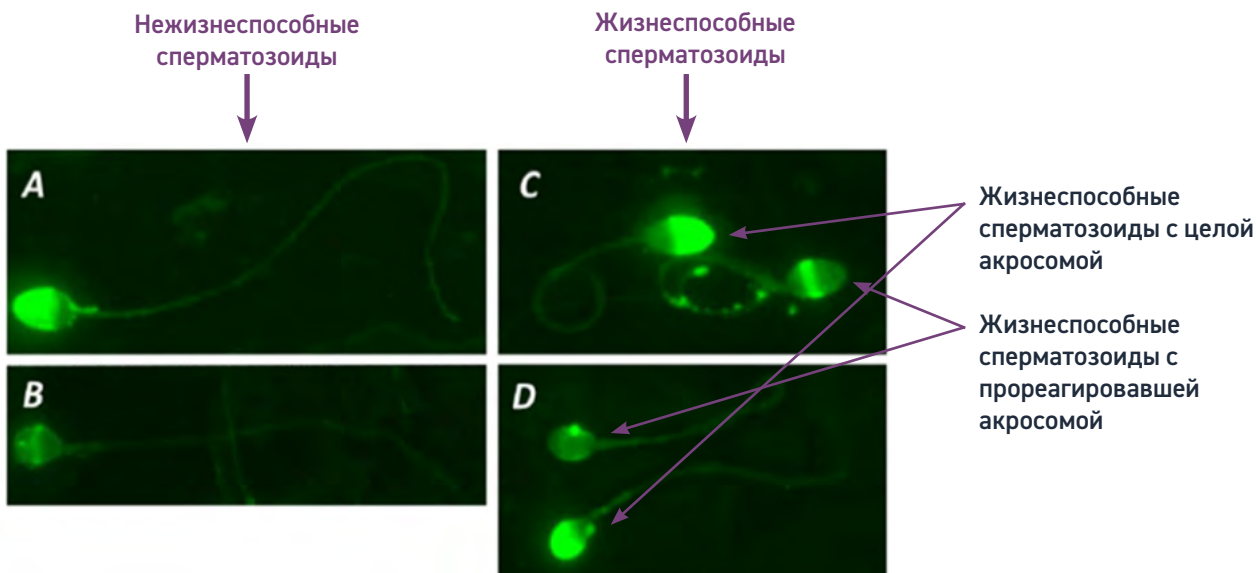
Распределите сперматозоиды по следующим категориям:

- Живые с целой акросомой: сперматозоиды с закрученным хвостом, у которых более половины головки ярко и равномерно флуоресцирует (рис. 4.1); и
- Живые с прореагировавшей акросомой: сперматозоиды с закрученным хвостом, демонстрирующие только флуоресцирующую полосу в экваториальном сегменте или полное отсутствие флуоресцирующей окраски в акросомной области (рис. 4.1).



- В рамках этого исследования мертвые сперматозоиды обычно не оцениваются, но мониторинг процентной доли мертвых клеток может позволить найти и устранить какие-либо ошибки в оценке/обработке полученных данных среди лиц, проходящих это исследование. Ожидается, что процентная доля мертвых клеток не будет значительно отличаться от их доли в исходном эякуляте.

Рис. 4.1 Примеры окрашенных FITC-PNA сперматозоидов с целой акросомой и прореагировавшей акросомой, жизнеспособных и нежизнеспособных сперматозоидов



У сперматозоидов с целой акросомой окрашена проксимальная часть головки (акросома), а у сперматозоидов с прореагировавшей акросомой окрашены полоски в экваториальном сегменте или постакросомная область. Закрученные хвосты указывают на жизнеспособность сперматозоидов после процедуры гипосмотического набухания (см. также **раздел 2.5.13.2 на стр. 78**).

4.2.2.8 Подсчет сперматозоидов с прореагировавшей акросомой

1. Подсчитайте число сперматозоидов с каждой категорией акросом (с целой акросомой и с прореагировавшей акросомой) с помощью лабораторного счетчика.
2. Оцените 200 сперматозоидов в каждом препарате для получения приемлемо низкой ошибки выборки.
 - Рассчитайте среднее значение и разность процентных долей сперматозоидов с прореагировавшей акросомой в двух препаратах.
 - Определите приемлемость различия по **таблице 2.3 на стр. 39**, в которой приводятся максимальные различия между двумя подсчетами, которые, как ожидается, могут возникнуть в 95% образцов только из-за ошибки выборки.
 - Если различие между процентными значениями приемлемо, укажите среднее процентное значение сперматозоидов с прореагировавшей акросомой. Если различие слишком велико, проведите повторную оценку двух предметных стекол.

- Укажите процентную долю сперматозоидов с прореагировавшей акросомой с точностью до ближайшего целого числа.

4.2.3 Оценка индуцированной акросомной реакции

Акросомная реакция может быть вызвана путем использования ионофоров (Acrosome Reaction following Ionophore Challenge, ARIC) (298), прогестерона (Acrosome Reaction following Progesterone Challenge, ARPC) (290) или других стимулов.

4.2.3.1 Реагенты

- Дополненный сбалансированный солевой раствор Эрла (sEBSS – см. **раздел 8.4 на стр. 263**), содержащий 3,0%-ный (30 г/л) BSA.

Примечание. Если проводится индукция прогестероном, следует использовать делипидизированную/очищенную на активированном угле сыворотку, с тем чтобы избежать загрязнения другими жирорастворимыми молекулами (включая гормоны).

- Диметилсульфоксид (ДМСО).
- Исходный раствор ионофора A23187, 1 ммоль/л: растворите 5,23 мг A23187 в 10 мл ДМСО, прогестерон 2–10 мкг/мл (299) или другие индукторы акросомной реакции (288).
Примечание. Могут существовать законодательные требования в отношении мер предосторожности, поэтому перед использованием ионофора следует тщательно оценить риски.
- 70%-ный (v/v) этанол.

4.2.3.2 Процедура

1. Оставьте свежий эякулят на 30–60 минут для полного разжижения.
2. Приготовьте среду sEBSS для индукции капацитации (среда должна быть свежей для каждого исследования).
3. Перед использованием нагрейте среду до 37°C, предпочтительно в аэрируемом инкубаторе с 5%-ной концентрацией (v/v) CO₂.
4. Подготовьте популяцию сперматозоидов с высокой подвижностью, свободную от загрязнений, таких как лейкоциты, половые клетки и мертвые сперматозоиды, путем центрифугирования в градиенте плотности (ЦГП) (**раздел 5.5 на стр. 188**) или методом всплытия с использованием свежей среды sEBSS.
5. Подготовьте пробирки для контрольного образца и тестируемых препаратов, поместив в каждую из них примерно 1 мл суспензии с 1×10⁶ подвижных сперматозоидов.

6. Инкубируйте суспензии сперматозоидов в течение 3 часов при 37°C и 5%-ной концентрации (v/v) CO₂, с тем чтобы вызвать капацитацию (ослабьте крышку пробирки, чтобы обеспечить газообмен). Если CO₂-инкубатор недоступен, используйте среду, забуференную **HEPES (раздел 8.4 на стр. 263)**, плотно закупорьте пробирки и инкубируйте при 37°C.

7. Добавьте 10 мкл исходного раствора A23187 (1 ммоль/л) в пробирки с тестируемыми препаратами для получения конечной концентрации 10 мкмоль/л.

8. Добавьте 10 мкл ДМСО в пробирку с контрольным образцом.

9. Инкубируйте все пробирки при 37°C в течение 15 минут.

10. Отберите небольшие аликвоты из каждой пробирки для определения подвижности сперматозоидов.

11. Выполните следующие шаги в соответствии с разделом об обработке эякулята (**раздел 4.2.2.4 на стр. 164**).

Выполните процедуры (**разделы 4.2.2.5 и 4.2.2.6**), оценку (**раздел 4.2.2.7**) и подсчет (**раздел 4.2.2.8**), как описано выше на стр. 164–166.

4.2.3.3 Контроль качества

- При проведении этого исследования необходимо каждый раз использовать образец для положительного контроля (эякулят мужчины, сперматозоиды которого ранее хорошо реагировали на ионофор или прогестерон).
- Каждый раз, когда готовится новая партия красителя, проводите перекрестный тест со старым красителем, используя сперматозоиды из образца для положительного контроля с известной реакцией, с тем чтобы убедиться, что краситель приготовлен правильно.

4.3 Оценка хроматина сперматозоидов

4.3.1 Справочная информация

Стабильность структуры хроматина сперматозоидов имеет фундаментальное значение для развития и качества эмбриона, по всей вероятности, благодаря защите и быстрой доступности отцовского генома (300). Нарушение стабильности хроматина сперматозоидов связано с более низким уровнем оплодотворения при использовании вспомогательных репродуктивных технологий (301). Аномалии в структуре хроматина сперматозоидов могут вызывать повреждения ДНК сперматозоидов, такие как двойные или одиночные разрывы нитей ДНК, из-за неправильной компактизации ДНК (т.е. аномалии, связанные с замещением гистонов протаминами). Нормальный статус хроматина сперматозоидов может быть оценен либо путем оценки разрывов нитей ДНК (**раздел 3.2 на стр. 97**), либо с помощью красителей, которые связываются с гистонами (анилиновый синий) или нуклеиновой кислотой (хромомицин А3) и оцениваются гистологически или с помощью проточной цитометрии.

4.3.2 Оценка с использованием анилинового синего

Анилиновый синий (АС) связывается с остатками лизина гистонов. Процентная доля сперматозоидов, окрашенных АС, может быть оценена как в цельной сперме, так и в отобранных (методом всплытия или путем центрифугирования в градиенте плотности (см. **раздел 5.5 на стр. 188**) сперматозоидах.

4.3.2.1 Протокол

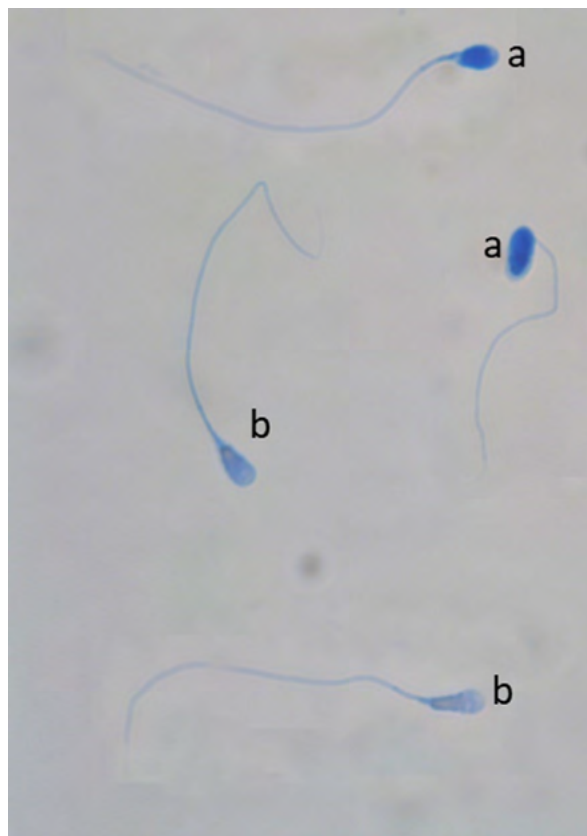
Реагенты

- Порошок АС растворяют в воде, содержащей 4%-ную ледяную уксусную кислоту (рН 3,5), при конечной концентрации 5%.

Процедура

1. Возьмите 1×10^6 сперматозоидов (если нет 1 миллиона, не менее 200 000 сперматозоидов).
2. В случае цельной спермы отмойте сперматозоиды дважды в любой культуральной среде для сперматозоидов (**раздел 5.3 на стр. 186**) (центрифугируйте при 500g в течение 5 минут при комнатной температуре). В случае отобранных сперматозоидов, центрифугируйте один раз при 500g в течение 5 минут.
3. Удалите супернатант и фиксируйте осадок в 50 мкл 4%-ного параформальдегида (конечная концентрация 200 000 сперматозоидов/10 мкл) в течение 30 минут при комнатной температуре.
4. Поместите каплю образца объемом 10 мкл на предметное стекло и высушите на воздухе.
5. Погрузите предметное стекло в раствор АС на 7 минут при комнатной температуре.
6. Промойте предметное стекло дважды в воде, чтобы удалить излишки красителя.
7. Высушите предметное стекло на воздухе.
8. Оцените под оптическим микроскопом с масляной иммерсией (объектив $\times 100$ и окулярное увеличение $\times 10$ – $12,5$). Должно быть оценено не менее 200 сперматозоидов.

Рис. 4.2 Пример АС-положительных (а) и АС-отрицательных (b) сперматозоидов под оптическим микроскопом (×1000, масляная иммерсия)



Из документа Марчиани и др. (302)

4.3.2.2 Проблемы

- В некоторых случаях оценка может быть затруднена. В частности, трудности могут возникнуть в случае агглютинации сперматозоидов.
- Оценка зависит от опыта лаборанта.

4.3.3 Оценка с использованием хромомицина А3

Хромомицин А3 (СМА3) конкурирует с протаминами за связывание с малой бороздкой спирали ДНК. Процентная доля сперматозоидов, окрашенных СМА3, может быть оценена либо в цельной сперме, либо в сперматозоидах, отобранных методом всплытия.

4.3.3.1 Протокол

Реагенты

1. Приготовьте исходный раствор СМА3:

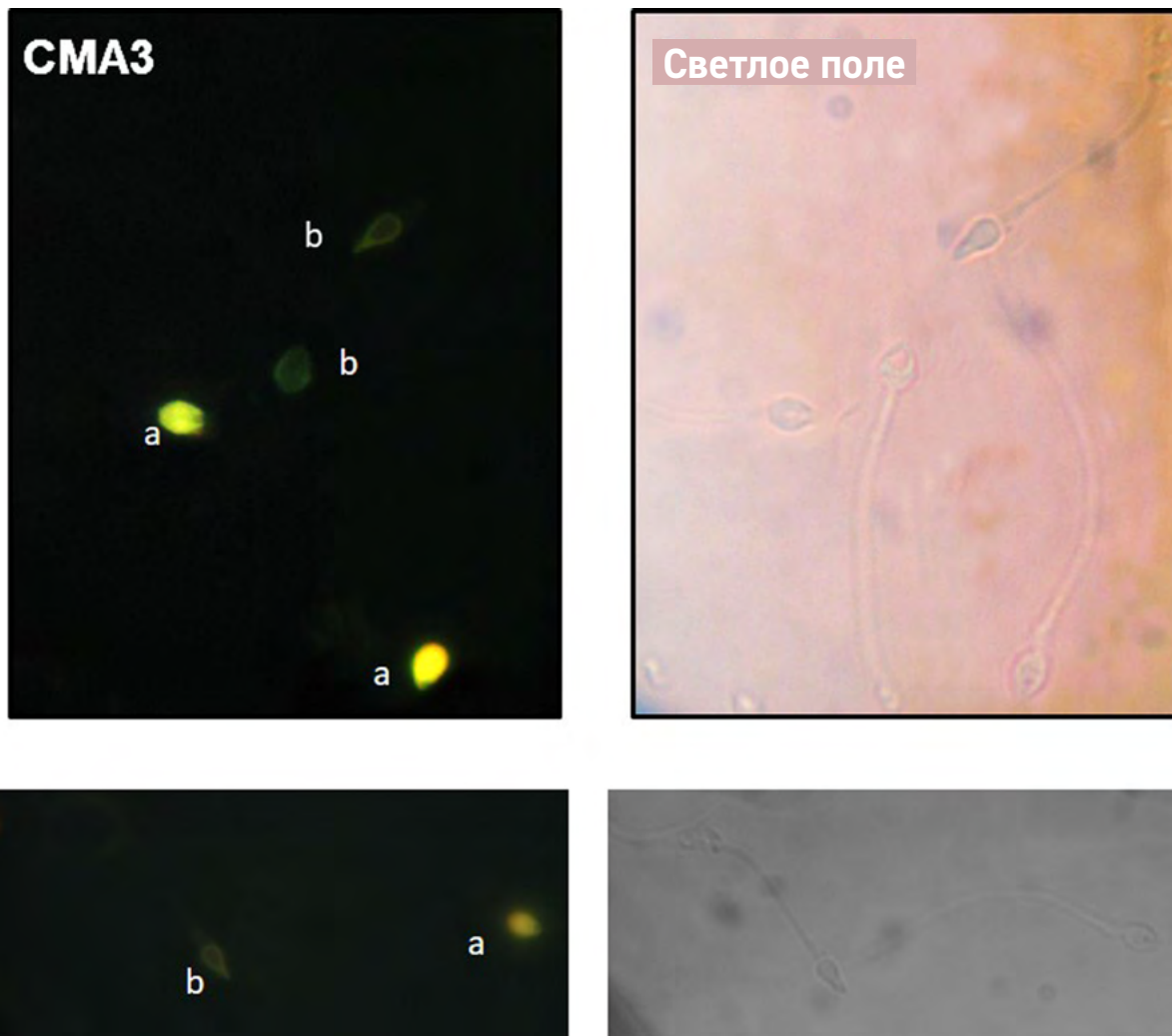
- приготовьте буферный раствор Мак-Илвейна (20 мл, должен храниться при комнатной температуре):

- добавьте 16,47 мл раствора Na_2HPO_4 0,2 М и 3,53 мл раствора лимонной кислоты 0,1 М10;
 - добавьте MgCl_2 для достижения конечной концентрации 10 мМ. рН должен быть 7,0;
 - растворите 5 мг порошка СМА3 в 10 мл буферного раствора Мак-Ильвейна, чтобы получить 2× исходный раствор. Аликвоты исходного раствора СМА3 можно хранить при температуре -20°C .
2. В момент использования разведите аликвоты эякулята 1 : 1 в буферном растворе Мак-Ильвейна для получения конечной концентрации СМА3 0,25 мг/мл.

Процедура

1. Возьмите 1×10^6 сперматозоидов (если нет 1 миллиона, не менее 400 000 сперматозоидов).
 - В случае цельной спермы отмойте сперматозоиды дважды в любой культуральной среде для сперматозоидов (**раздел 5.3 на стр. 186**) и центрифугируйте при 500g в течение 5 минут при комнатной температуре.
 - В случае отобранных сперматозоидов центрифугируйте один раз при 500g в течение 5 минут.
2. Удалите супернатант и зафиксируйте осадок в 50 мкл 4%-ного параформальдегида (конечная концентрация 400 000 сперматозоидов/10 мкл) в течение 30 минут при комнатной температуре.
3. Отберите аликвоту объемом 10 мкл и центрифугируйте при 300g в течение 7 минут при комнатной температуре.
4. Удалите супернатант и промойте один раз в DPBS путем центрифугирования при 300g в течение 7 минут при комнатной температуре.
5. Удалите супернатант, добавьте 100 мкл раствора СМА3 (0,25 мг/мл) и инкубируйте в течение 20 минут при комнатной температуре.
6. Добавьте 200 мкл буферного раствора Мак-Ильвейна и центрифугируйте при 300g в течение 7 минут при комнатной температуре.
7. Удалите супернатант, ресуспендируйте осадок в 10 мкл буферного раствора Мак-Ильвейна и поместите его на предметное стекло.
8. Высушите каплю на воздухе, добавьте каплю DPBS и поместите на нее покровное стекло.
9. Считывайте под флуоресцентным микроскопом с увеличением 1000× (с масляной иммерсией) (длина волны возбуждающего излучения 445 нм, длина волны эмиссионного излучения 575 нм). Должно быть подсчитано не менее 200 сперматозоидов.

Рис. 4.3 Примеры СМА3-положительных (а) и СМА3-отрицательных (b) сперматозоидов (левая панель)



На правой панели (светлое поле) можно увидеть СМА3-отрицательные сперматозоиды в том же поле. Адаптировано из документа Марчиани и др. (303).

4.3.3.2 Проблемы

- В некоторых случаях оценка может быть затруднена. В частности, трудности могут возникнуть в случае агглютинации сперматозоидов или из-за флуоресцентного фона.
- Оценка зависит от опыта лаборанта.

4.4 Трансмембранный поток и перенос ионов в сперматозоидах

4.4.1 Справочная информация

Функциональный анализ трансмембранного потока и переноса ионов в сперматозоидах может стать путем к поиску диагностических инструментов для лучшего понимания мужского фактора бесплодия и нарушения функций мужских репродуктивных органов. Навигация, капацитация, гиперактивация и акросомный экзоцитоз регулируются изменениями внутриклеточного рН (pH_i), мембранного напряжения (V_m) и внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Эти сигнальные события опосредуются взаимодействием уникальных, в основном специфических для сперматозоидов ионных каналов, обменников и транспортеров, таких как Ca^{2+} каналы CatSper, K^+ каналы Slo3, H^+ каналы H_v1 , Na^+/H^+ обменники (sNHE, NHA1, NHA2), Ca^{2+} АТФазы (PMCA4) и транспортеры Mg^{2+} (CNNM2, CNNM4). Многие случаи пока необъяснимого нарушения функции сперматозоидов могут быть связаны с нарушением функции одного или нескольких из этих белков. Это предположение подтверждается тем наблюдением, что генетические aberrации, влияющие на гены CatSper, нарушение функции или экспрессии CatSper и нарушение функции каналов K^+ , связаны с мужским бесплодием (304). Рутинных диагностических процедур для оценки функции ионных каналов, обменников и транспортеров в сперматозоидах пациентов на сегодняшний день нет. Вместе с тем разработаны исследовательские протоколы для изучения (с низкой или средней пропускной способностью) активности ионных каналов в сперматозоидах пациентов в рамках клинических исследований.

4.4.2 Электрофизиологическое исследование и кинетическая флуориметрия Ca^{2+} для оценки функции CatSper

Специфический для сперматозоидов, активируемый прогестероном канал CatSper контролирует приток Ca^{2+} в жгутик, тем самым оказывая воздействие на плавательные движения сперматозоида. Потеря функции CatSper связана с мужским бесплодием и неудачными попытками ЭКО (304–307). Это позволяет предположить, что сперматозоиды с нарушенной функцией CatSper могут оплодотворять яйцеклетки только с помощью ИКСИ.

Функция CatSper в сперматозоидах человека может быть изучена с помощью электрофизиологического исследования и кинетической флуориметрии Ca^{2+} . Подвижные сперматозоиды очищают с помощью процедуры всплытия или ЦГП. Электрофизиологическая регистрация токов CatSper в сперматозоидах человека проводится в растворах, не содержащих двухвалентных ионов, в цельноклеточной конфигурации, при этом стеклянный электрод размещают в цитоплазматической капле или в области шейки. После формирования гигаомного (мера электрического сопротивления, $G\Omega$) уплотнения и цельноклеточной конфигурации прототипические моновалентные токи CatSper могут быть вызваны деполяризацией мембранного напряжения. Отсутствие значительного ослабления этих токов указывает на дисфункцию CatSper.

Для флуориметрии Ca^{2+} сперматозоиды в суспензии нагружают флуоресцентным индикаторным красителем Ca^{2+} (например Fura-2 или



Fluo-4). Для удаления избытка внеклеточного индикатора после нагрузки сперматозоиды осаждают центрифугированием и ресуспендируют в свежем буферном растворе, а $[Ca^{2+}]_i$ сперматозоидов в суспензии отслеживают по флуоресцентному излучению индикаторов, например в микротитрационных планшетах или кюветах, с помощью планшет-ридера для визуализации флуоресценции или спектрометра соответственно. Флуоресценция, испускаемая индикатором Ca^{2+} , регистрируется до и после введения в лунку планшета или кювету агониста CatSper (например прогестерона, простагландинов), буферного раствора (отрицательный контроль) и ионофора Ca^{2+} иономицина (положительный контроль). Неспособность агониста(-ов) CatSper, но не иономицина, усилить флуоресценцию, т.е. $[Ca^{2+}]_i$, свидетельствует о потере функции CatSper. Только недавно с помощью этого метода потеря функции CatSper была выявлена у двух бесплодных пациентов. Генетическая диагностика показала, что потеря функции CatSper и, следовательно, бесплодие вызвано генетической абберацией, затронувшей ген CatSper. Следует отметить, что для изучения CatSper в сперматозоидах пациентов использовалась также визуализация $[Ca^{2+}]_i$ в одном сперматозоиде для получения информации об отдельных сперматозоидах, например о доле реагирующих клеток и наличии субпопуляций. Этот результат показал, что для субфертильных пациентов характерна сниженная чувствительность к прогестерону, которая коррелирует с частотой оплодотворения (308).

4.4.3 Электрофизиологические и флуориметрические методы изучения функции K^+ каналов

Функции K^+ каналов, а именно Slo3, в сперматозоидах человека можно изучать с низкой и средней пропускной способностью методом фиксации потенциала целевой клетки и флуориметрии V_m соответственно. Slo3 представляет собой основной канал K^+ в сперматозоидах человека. Он активируется Ca^{2+} и поэтому устанавливает мембранный потенциал сперматозоидов человека в зависимости от $[Ca^{2+}]_i$.

При электрофизиологической фиксации потенциала целевой клетки с использованием внеклеточных растворов, содержащих двухвалентные ионы для подавления токов CatSper, и раствора для пипетки на основе K^+ прототипические токи Slo3 могут быть вызваны деполяризацией мембранного напряжения. Этот подход позволил выявить у нескольких пациентов аномальную активность K^+ каналов и деполяризованный мембранный потенциал покоя, а также низкую частоту оплодотворения при ЭКО.

Для оценки активности K^+ каналов в сперматозоидах используется метод скрининга со средней пропускной способностью, основанный на использовании чувствительных к напряжению флуоресцентных индикаторов. Эти индикаторы регистрируют изменения V_m как изменения их флуоресцентного излучения, например путем зависящего от V_m перераспределения между внеклеточной средой и цитоплазмой. Для скрининга сперматозоиды, очищенные или разведенные в эякуляте, инкубируются с индикатором в течение нескольких минут. После этого флуоресценция регистрируется либо в популяции в микротитрационных планшетах или кюветах с помощью планшет-ридера для визуализации флуоресценции или спектрометра соответственно, либо на уровне отдельных клеток с помощью проточной цитометрии. Затем сперматозоиды подвергаются воздействию ионофора K^+ валиномицина и растворов, содержащих различные концентрации K^+ .

Валиномицин устанавливает мембранный потенциал на соответствующем уровне потенциала Нернста для K^+ . Таким образом, флуоресценция может быть преобразована в значения V_m , что позволяет провести количественную оценку мембранного потенциала покоя сперматозоидов (V_{rest}), называемую калибровкой нулевой точки K^+ . Несколько исследований, использовавших этот метод для определения V_{rest} и, таким образом, косвенного определения активности каналов K^+ в сперматозоидах человека, выявили связь между V_{rest} и частотой оплодотворения при ЭКО.

4.4.4 Методы выявления (дис)функции ионных транспортеров и обменников

На сегодняшний день не существует методов, позволяющих с достаточной пропускной способностью оценить активность ионных обменников и транспортеров в сперматозоидах человека. Поэтому их роль в дисфункции сперматозоидов остается неустановленной.

4.4.5 Резюме

За последние десять лет новые и разрабатываемые технологии продемонстрировали, что функция сперматозоидов (и, следовательно, оплодотворение) управляется уникальным набором специфических для сперматозоидов ионных каналов, транспортеров и обменников. Вместе с тем нарушения функций этих ключевых сигнальных компонентов не могут быть обнаружены в рамках обычных исследований эякулята. Для большинства этих белков функциональные тесты отсутствуют, а существующие методы оценки функции CatSper или Slo3 слишком сложны для использования в клинических лабораториях. В этой связи для более глубокого понимания патологических механизмов, лежащих в основе нарушения функции сперматозоидов, необходим набор новых, простых для проведения тестов, подходящих для беспрепятственного включения в число осуществляемых на сегодняшний день исследований эякулята.

4.5 Компьютерный анализ эякулята (CASA)

4.5.1 Использование CASA для оценки подвижности сперматозоидов

4.5.1.1 Справочная информация

Системы CASA лучше всего использовать для кинематического анализа сперматозоидов, поскольку они позволяют обнаруживать и анализировать подвижные клетки. Оценки процентной доли подвижных клеток могут быть ненадежными, так как они зависят от определения числа неподвижных сперматозоидов, с которыми можно спутать дебрис.

На эффективность использования приборов CASA влияют многие факторы, такие как подготовка образца, частота кадров, концентрация сперматозоидов и глубина счетной камеры (45, 46, 136, 309, 310). Тем не менее, при соблюдении соответствующих процедур могут быть получены надежные и воспроизводимые результаты (309). Все сотрудники должны ознакомиться с руководствами по

использованию CASA (311, 312) и пройти надлежащую подготовку как в области использования оборудования CASA, так и в отношении сильных и слабых сторон этой технологии.

При использовании CASA для получения параметров движения необходимо проанализировать треки не менее 200 подвижных сперматозоидов в каждом образце. Это означает, что необходимо обнаружить гораздо больше сперматозоидов. Если сперматозоиды необходимо классифицировать по типу движения или планируется провести другие исследования вариативности параметров в образце, потребуются треки не менее 200, а по возможности 400 подвижных сперматозоидов.

Прибор CASA необходимо соединить с компьютерным программным обеспечением, позволяющим организовать данные и провести статистический анализ. Распределение многих параметров движения не подчиняется закону распределения Гаусса; поэтому для обобщения центральной тенденции каждой переменной лучше использовать медиану, а не среднее значение. Перед проведением некоторых статистических анализов для измерения параметров отдельных сперматозоидов могут потребоваться математические преобразования.

4.5.1.2 Процедура

Для обеспечения оптимальной работы необходимо правильно установить все блоки CASA. Производители указывают конкретные настройки, но для обеспечения необходимой степени надежности и воспроизводимости пользователи должны убедиться в том, что прибор работает надлежащим образом. Крайне важно использовать подходящие материалы для КК, например видеозаписи (**раздел 8.6.2 на стр. 273**). Некоторые авторы касаются вопросов использования систем CASA в своих работах (46, 309, 312–314).

4.5.1.3 Подготовка образца эякулята

Образцы эякулята для CASA должны быть собраны и подготовлены в соответствии с описанием, приведенным в главе 2. Система CASA должна поддерживать образец при стабильной температуре 37°C, поскольку подвижность сперматозоидов человека в значительной мере зависит от изменений температуры. Характеристики подвижности и концентрацию сперматозоидов можно оценить в неразведенном эякуляте, если он не содержит избыточного количества дебриса или других загрязнителей. В зависимости от системы CASA подвижность сперматозоидов может быть рассчитана в образцах с концентрацией сперматозоидов от 2×10^6 /мл до 50×10^6 /мл (102). Высокая концентрация сперматозоидов в образцах (например более 50×10^6 /мл) может часто приводить к ошибкам. Такие образцы следует разводить, предпочтительно семенной жидкостью того же пациента. В случае исследования неразведенного эякулята:

1. центрифугируйте часть образца эякулята на высокой скорости (до 16 000g или на максимально доступной) в течение 6 минут для получения семенной жидкости, свободной от сперматозоидов;



2. разведите нативный образец эякулята чистой семенной плазмой для достижения концентрации ниже 50×10^6 /мл.

Следует отметить, что при этом свойства эякулята могут также меняться; поэтому параметры подвижности, которые зависят от гидродинамических свойств жидкости (вязкость, вязкоэластичность) или других факторов окружающей среды, могут быть подвержены изменениям.

Надежные результаты оценки подвижности могут быть получены в одноразовых счетных камерах глубиной 20 мкм; обычно следует оценивать две камеры. Необходимо проанализировать несколько репрезентативных полей зрения. То, каким образом выбор этих полей влияет на результаты, детально не изучалось. Вместе с тем поля должны быть распределены по всей площади камеры. Как показывают системы, исследование как минимум шести полей зрения в каждой камере (всего 12 полей зрения) обычно дает надежный результат. По возможности, в каждой камере следует оценить не менее 200 подвижных сперматозоидов. Принципы КК аналогичны принципам, используемым при стандартной оценке подвижности (**раздел 2.4.6 на стр. 27**). Образцы могут быть проанализированы либо сразу, либо после видеозаписи. Обеспечить стандартизацию и выполнение процедур КК проще при анализе видеозаписей (**раздел 8.6.2 на стр. 273**).

Существуют некоторые разногласия относительно того, как долго следует наблюдать за сперматозоидами для получения точных результатов, но для базовых измерений CASA достаточно по меньшей мере 1 секунды (46). Продолжительность наблюдения за плавающими клетками может оказать значительное воздействие на результаты (315); сравнение результатов исследований разной продолжительности следует проводить с осторожностью.

4.5.1.4 Терминология CASA

Некоторыми стандартными переменными, измеряемыми с помощью систем CASA, как показано на рис. 4.4, являются:

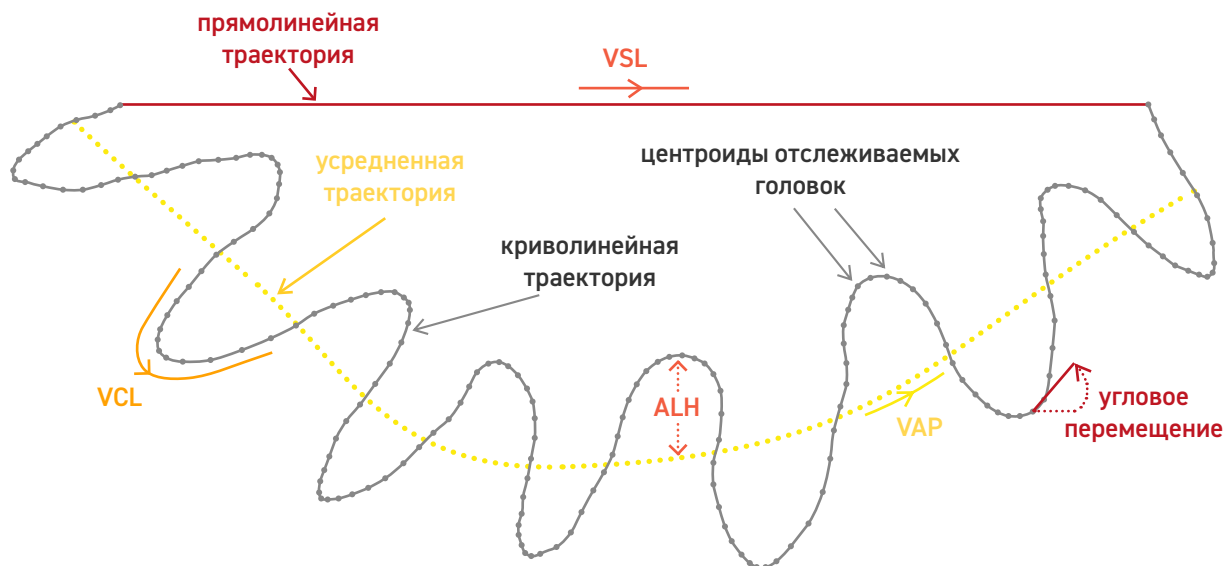
- VCL, скорость по криволинейной траектории (мкм/с): усредненная по времени скорость движения головки сперматозоида по траектории, прокладываемой сперматозоидом, которую можно наблюдать в двух измерениях под микроскопом.
- VSL, скорость по прямолинейной траектории (мкм/с): скорость, рассчитанная по прямой линии между первой и последней точками траектории.
- VAP, скорость по усредненной траектории (мкм/с): усредненная по времени скорость, рассчитанная по усредненной траектории. Эта траектория определяется как сглаженная кривая и рассчитывается в соответствии с алгоритмом, встроенным в систему CASA; эти алгоритмы отличаются в разных системах, поэтому значения могут быть несопоставимы между системами или иметь разные параметры получения изображений, такие как частота кадров.
- ALH, амплитуда латерального смещения головки (в мкм): величина латерального смещения головки сперматозоида от усредненной траектории. ALH часто выражается как максимальное или среднее значение таких



смещений. Различные системы CASA рассчитывают ALH по разным алгоритмам, поэтому значения могут быть несопоставимы.

- MAD, среднее угловое смещение (в градусах): усредненные по времени абсолютные значения мгновенного угла поворота криволинейной траектории. Следует отметить, что здесь не измеряется угол поворота направления, в котором движется головка сперматозоида.
- Другие часто используемые показатели являются производными от расчета этих пяти переменных:
 - LIN, линейность: линейность криволинейной траектории (прямолинейная скорость / криволинейная скорость);
 - WOB, угловое колебание: показатель отклонения криволинейной траектории от усредненной (скорость по усредненной траектории / криволинейная скорость);
 - STR, прямолинейность: линейность усредненной траектории (прямолинейная скорость / скорость по усредненной траектории); и
 - BCF, частота биения головки (Hz): средняя частота, с которой криволинейная траектория пересекает усредненную траекторию. Вместе с тем следует отметить, что BCF, как было продемонстрировано, не коррелирует с частотой биения жгутика (316).
 - D, фрактальная размерность: количественная оценка свойств «заполнения пространства» кривыми на плоскости (310).

Рис. 4.4 Стандартная терминология для переменных, измеряемых системами CASA



Примечание. В различных приборах CASA используются разные математические алгоритмы для вычисления многих из этих переменных движения. Сопоставимость измерений на всех приборах пока неизвестна.

4.5.2 Использование CASA для оценки гиперактивации сперматозоидов

Гиперактивация – это важный биологический феномен сперматозоидов человека, проявляющийся во время капацитации (процесс приобретения способности к оплодотворению) и заключающийся в поведенческом изменении формы волны жгутика. Гиперактивация обычно характеризуется увеличением амплитуды и снижением частоты биения жгутика, а также его непрогрессивными движениями «рыскания» из стороны в сторону (317).

Надежно и четко определить сложные параметры движения жгутика гиперактивированного сперматозоида в рамках проводимого вручную анализа сложно. Поэтому авторы предлагают различные алгоритмы и компьютерные системы для количественного анализа движения отдельных сперматозоидов с целью оценки стереотипов подвижности. Эти исследования основаны на производных величинах, полученных путем отслеживания движения головки сперматозоида (318, 319). Современные вычислительные возможности позволяют одновременно оценивать кинетические параметры тысяч сперматозоидов и классифицировать их (320). Непосредственное измерение формы волны жгутика может быть также использовано для более точного понимания изменения кинематических параметров во время гиперактивации (321).

4.5.3 Использование CASA для морфологической оценки сперматозоидов

Анализ видеоизображений может обеспечить значительный прогресс в проведении морфологической оценки сперматозоидов в плане количественной оценки, объективности и воспроизводимости. Имеются коммерческие системы для морфологической оценки головки, средней части и, возможно, основной части сперматозоидов. Вместе с тем дефекты хвоста, влияющие на подвижность, могут быть точнее оценены с помощью CASA для измерения подвижности и движения. Использование систем CASA для морфологической оценки зависит от высокого уровня стандартизации и качества окрашивания клеток, причем различия в окрашивании могут приводить к искажению результатов. По этой причине в целях устранения таких различий при проведении морфологической оценки с помощью CASA часто может быть разумным использование автоматизированных систем окрашивания.

Автоматизированные системы для морфологического анализа потенциально обеспечивают более высокие уровни объективности, точности и воспроизводимости, чем ручные методики (95). Уровни точности и воспроизводимости могут достигать по меньшей мере 92% (322), что превосходит аналогичные параметры оценки, проводимой вручную опытными специалистами. Вместе с тем воспроизводимость и точность результатов компьютерной морфометрической оценки сперматозоидов (CASMA) могут быть нарушены из-за методических несоответствий, таких как фокус, освещение, подготовка образца и его окрашивание (323, 324), а также из-за технических трудностей, связанных с правильной дифференциацией головок сперматозоидов и дебриса в эякуляте, особенно при низкой концентрации сперматозоидов (322, 324–326). По своей сути автоматизированная оценка не может компенсировать недостатки и артефакты подготовки. Таким образом, небольшие различия в оттенке фона по отношению к окрашиванию клеток могут приводить к неправильной классификации или невозможности идентифицировать клетку как сперматозоид и, следовательно, к искажению результатов.

Как и при морфологической оценке, проводимой вручную, для обеспечения сопоставимых и надежных результатов необходимо стандартизировать процедуры и инструменты и обеспечить КК. Для ослабления фона при видеозаписи в рамках CASMA эякулят можно обрабатывать в соответствии с описанием в разделе **«Образцы эякулята с большим количеством дебриса или с повышенной вязкостью» на стр. 53**. При низкой концентрации сперматозоидов (менее 2×10^6 /мл) в образцах ее необходимо повысить путем центрифугирования в соответствии с описанием в разделе **«Образцы эякулята с низкой концентрацией сперматозоидов» на стр. 52**. Вместе с тем следует отметить, что центрифугирование может оказать воздействие на морфологию сперматозоидов, и его использование должно быть зафиксировано.

В двух исследованиях сообщалось о значительной взаимосвязи между результатами CASMA и ожидаемыми результатами в отношении фертильности. По данным Коэтзи и др. (327), нормальные результаты автоматизированной морфологической оценки сперматозоидов являются значимыми предикторами как частоты оплодотворения *in vitro*, так и наступления беременности. По данным Гарретта и др. (102), процентная доля сперматозоидов в эякуляте с морфологией головки, характерной для сперматозоидов, способных связываться с блестящей оболочкой («предпочитающих зону пеллюцида», %Z), а также скорость по прямолинейной траектории (VSL) в эякуляте были в значительной мере и независимым образом связаны с частотой наступления естественной беременности в большой группе субфертильных пар. Взаимосвязь %Z и VSL с фертильностью представляется непрерывной, и какого-либо порогового значения, выше которого не происходило бы дальнейшего увеличения частоты наступления беременности, не выявлено. Для более эффективного применения CASA в целях измерения морфологии сперматозоидов необходимы дополнительные исследования, касающиеся показателей фертильности, а также функции мужских репродуктивных органов и ее нарушений, в больших популяциях.

Автоматизированные системы могут быть полезны для получения дополнительных исследовательских данных (в том числе о морфологических субпопуляциях сперматозоидов, целостности плазматической мембраны, энергетическом индексе сперматозоидов) (328–330) и для систем КК, но для демонстрации их преимуществ для клинических целей необходимы дополнительные исследования.

Отсутствие ВКК может приводить к большому количеству ошибок в результатах CASA между системами и лабораториями. Поэтому необходимо стандартизировать процесс и КК для CASA (331). Несмотря на появляющиеся результаты сравнительных исследований (332–337), пока еще не собрано достаточного количества фактических данных, которые позволили бы использовать компьютерный анализ CASA в широкой клинической практике.

4.6 Новые технологии

В последние годы разрабатываются многочисленные новые технологии, которые могут значительно повысить эффективность компьютерного анализа и его способность выявления скрытых закономерностей в ближайшем будущем. Эти методы и процессы можно разделить на вычислительные (разработка алгоритмов) и технологические (включение новых устройств или функциональных тестов).



4.6.1 Вычислительные достижения

Достижения в области создания алгоритмов обработки изображений позволяют анализировать сперматозоиды в большем количестве и с большей детализацией, чем это было возможно ранее. Было продемонстрировано, что новые системы способны выделять треки отдельных клеток в образцах с гораздо более высокой концентрацией клеток по сравнению с традиционным CASA, как показано на рис. 4.5а (338, 339). Использование кинематических измерений CASA для распределения сперматозоидов по разным подгруппам способствует улучшению понимания и мониторинга изменений в подвижности клеток (320).

В настоящее время для оценки подвижности сперматозоидов помимо измерения скорости движения головки можно автоматически отслеживать форму волны жгутика плавающих клеток (см. **рис. 4.5b на стр. 182**) (316). Для обеспечения видимости биения жгутика и его нахождения в фокусе при визуализации клеток требуется проявлять повышенную осторожность, вместе с тем отслеживание формы волны жгутика может открыть широкие диагностические, токсикологические и терапевтические возможности в области исследований сперматозоидов человека. Визуализация биения жгутика в жидкости с известной вязкостью позволяет также оценивать энергию, затрачиваемую клеткой, или ее изменение в популяции.

Для расширения доступа к компьютерному анализу в дополнение к коммерческим системам CASA разработано несколько бесплатных программ и проектов с открытым исходным кодом (316, 340).



Примечание. При использовании новых технологий, не сертифицированных для клинического применения, следует проявлять осторожность, но их использование для дальнейшего изучения вопросов, возникающих в ходе исследований, необходимо поощрять.

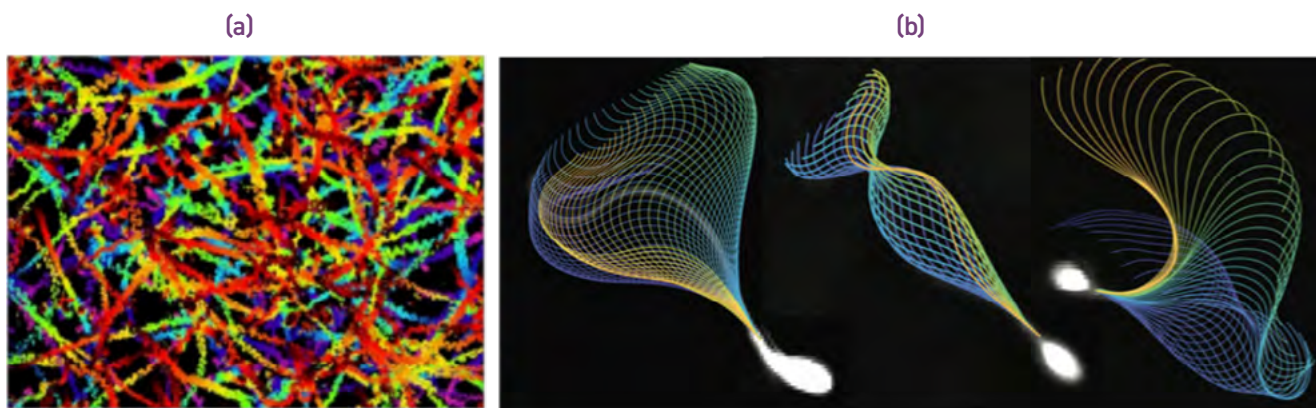
4.6.2 Технологические достижения

Разработка CASA и другие новые достижения в вычислениях все чаще дополняются использованием вспомогательных технологий для улучшения качества и доступности средств диагностики.

Существующие системы CASA, обычно предназначенные для лабораторного использования, зачастую дороги и недоступны. Использование смартфонов может иметь большой потенциал для исследований эякулята, поскольку они мобильны, оснащены высококачественными цифровыми камерами и могут быть легко присоединены к микроскопу (341). В настоящее время устройства на базе смартфонов не могут обеспечить качество и точность, необходимые для полного исследования эякулята, вместе с тем широкое использование таких устройств может стать полезным для раннего обращения мужчин за надлежащей медицинской консультацией, обследованием и этиотропной терапией. При использовании новых технологий, не сертифицированных для клинического применения, следует проявлять осторожность, но их использование для дальнейшего изучения вопросов, возникающих в ходе исследований, необходимо поощрять.



Рис. 4.5 Примеры графического выражения различных приложений CASA



а) Типичное цветное изображение образца с плотной концентрацией сперматозоидов, сделанное в течение 10 секунд под объективом 10× (каждая траектория представляет подвижный сперматозоид) (339); б) Форма волны жгутика сперматозоида (слева направо): в среде с низкой вязкостью, в среде с высокой вязкостью и в гиперактивированном состоянии (316).

- 1. Введение
- 2. Базовое исследование
- 3. Расширенное исследование
- 4. Углубленные исследования
- 5. Методы подготовки сперматозоидов
- 6. Криоконсервация сперматозоидов
- 7. Обеспечение качества и контроль качества
- 8. Приложения
- 9. Справочная литература



Глава 5. Методы подготовки сперматозоидов

5.1 Введение	183
5.2 Общие принципы	185
5.3 Простое отмывание.....	186
5.4 Прямое всплытие	187
5.5 Прерывистые градиенты плотности	188
5.6 Сортировка клеток с магнитной активацией (MACS)..	189
5.7 Подготовка образцов ВИЧ-инфицированного эякулята	190
5.8 Подготовка сперматозоидов из ткани яичка и придатка яичка.....	191
5.9 Подготовка образцов при ретроградной эякуляции...	192
5.10 Подготовка образцов при ассистированной эякуляции.....	193

5.1 Введение

5.1.1 Обоснование

Для некоторых целей сперматозоиды необходимо отделять от семенной плазмы, например для проведения диагностических и исследовательских тестов функциональных параметров, оценки воздействия состава среды и извлечения сперматозоидов для вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Предпосылками, на основании которых рассматриваются методы подготовки сперматозоидов для ВРТ, являются обеспечение хорошего качества сперматозоидов и устранение факторов, оказывающих негативное воздействие на оплодотворение. Если необходимо провести исследование функции сперматозоидов, крайне важно отделить их от семенной плазмы в течение 1 часа после эякуляции, с тем чтобы ограничить любое негативное воздействие клеток, не относящихся к сперматозоидам (284), и пагубные последствия повышения осмоляльности в образцах эякулята, хранящихся *in vitro* (147, 342).



Идеальный метод подготовки сперматозоидов должен обеспечить получение высокофункциональной популяции сперматозоидов, которая сохраняет ДНК и не вызывает дисфункцию из-за выработки АФК сперматозоидами и лейкоцитами.



Несмотря на то, что некоторые компоненты смешанной семенной плазмы, по-видимому, способствуют проникновению сперматозоидов в цервикальную слизь по сравнению, например, с раствором **Тироде** (документ Оверстрита и др., 1980 г.), негативное воздействие жидкости семенных пузырьков на подвижность, выживание и защиту ДНК сперматозоидов документально подтверждено (13, 256), как и присутствие «факторов декапацитации» в семенной плазме (343). Кроме того, некоторые компоненты семенной плазмы препятствуют наступлению беременности в тех случаях, когда естественные барьеры преодолеваются с помощью ВРТ, таких как ВМИ или ЭКО. Отделение сперматозоидов человека от семенной плазмы и их обработка для получения конечного препарата, содержащего высокую процентную долю морфологически нормальных и подвижных клеток со сниженным уровнем повреждения ДНК и свободного от дебриса, неполовых клеток и мертвых сперматозоидов, важны как для клинической практики, так и для обеспечения прогностической значимости исследования.

5.1.1.1 Выбор метода

Выбор метода подготовки сперматозоидов зависит от свойств образца эякулята (344, 345) и его назначения. Для вспомогательной репродукции, включая процедуры ЭКО, методы подготовки сперматозоидов должны обеспечивать получение популяции сперматозоидов с минимальным повреждением ДНК (346). Идеальный метод подготовки сперматозоидов должен обеспечить получение высокофункциональной популяции сперматозоидов (347), которая сохраняет ДНК и не вызывает дисфункцию из-за выработки АФК сперматозоидами и лейкоцитами (348, 349). Извлеченные сперматозоиды должны иметь подходящую морфологию и сохранять функциональную подвижность для рассматриваемого спектра ВРТ. Для подготовки нормозооспермических образцов для ВМИ предлагается разведение эякулята культуральной средой и центрифугирование (345, 350), при этом выбор метода зависит также от показаний или предназначения. Например, метод прямого всплытия целесообразно применять при отборе подвижных сперматозоидов, поскольку в его основе лежит способность сперматозоидов всплывать в культуральной среде. Исследования показали, что фрагментация ДНК, для которой характерны одностебельные или двустебельные повреждения, отрицательно коррелирует с результатами ВРТ (346, 351, 352) (**раздел 3.2 на стр. 97**). Как метод прямого всплытия, так и метод всплытия осадка способствуют значительному снижению общего показателя фрагментации ДНК, хотя при использовании метода всплытия осадка предусматривается центрифугирование, которое может повлиять на другие функциональные параметры сперматозоидов (353, 354). В случаях, когда образцы эякулята считаются в основном нормальными, часто используется метод прямого всплытия, тогда как в случаях тяжелой олигозооспермии, тератозооспермии или астенозооспермии предпочтение обычно отдается ЦГП из-за более высокой результативности и, следовательно, большего общего количества извлеченных подвижных сперматозоидов. Для оптимальной обработки отдельных образцов с учетом их специфических свойств могут быть также изменены градиенты плотности: может быть уменьшен общий объем градиентного материала, что ограничивает расстояние до осаждения сперматозоидов и максимально увеличивает общее количество извлеченных подвижных сперматозоидов, или для образцов с высокой вязкостью может быть увеличено время центрифугирования.

Каждая лаборатория должна определить центробежную силу и время центрифугирования, необходимые для формирования приемлемого осадка сперматозоидов. Если число сперматозоидов крайне незначительно, может возникнуть необходимость в изменении центробежной силы или времени центрифугирования, чтобы расширить возможности для извлечения максимального количества сперматозоидов. Модификации рекомендуемого времени центрифугирования или центробежной силы должны быть тщательно протестированы до клинического применения. Наиболее подходящий метод подготовки можно определить по функциональным параметрам подготовленных сперматозоидов, определяемым, например, по их подвижности (**раздел 2.4.6 на стр. 27**) и жизнеспособности (**раздел 2.4.7 на стр. 30**).

5.1.1.2 Эффективность отделения сперматозоидов от семенной плазмы и обращение с возбудителями инфекции

Эффективность метода отбора сперматозоидов обычно выражается в абсолютном количестве сперматозоидов, общем числе подвижных сперматозоидов или извлеченных морфологически нормальных подвижных сперматозоидов. Метод всплытия обычно позволяет извлечь меньше подвижных сперматозоидов (менее 20%), чем ЦГП (более 20%). Метод всплытия и ЦГП приводят также к разным уровням загрязнения конечного препарата эякулята компонентами семенной плазмы. При использовании цинка из секрета простаты в качестве маркера растворимых компонентов эякулята была продемонстрирована зависящая от времени диффузия цинка из эякулята в покрывающую среду для всплытия (355). Конечная концентрация цинка в препаратах, подготовленных методом всплытия, была выше, чем после центрифугирования в градиенте плотности.

Образцы эякулята могут содержать возбудителей опасных инфекционных заболеваний, поэтому технический персонал должен обращаться с ними с особой осторожностью как с биологически опасными веществами. Помимо удаления некачественных, в том числе неподвижных, сперматозоидов, в рамках подготовки эякулята необходимо удалять другие клетки, такие как лейкоциты и бактерии (356), а также токсичные или биологически активные вещества (347). Методы подготовки эякулята не могут считаться на 100% эффективными с точки зрения удаления возбудителей инфекционных заболеваний из эякулята (**раздел 5.7 на стр. 190**). Необходимо строго соблюдать правила техники безопасности, изложенные в **разделе 8.2 на стр. 249**. В основе лабораторной безопасности лежит надлежащая лабораторная практика (48, 357).

5.2 Общие принципы

Некоторые из доступных методов подготовки сперматозоидов описаны в следующих разделах. Для всех из них в качестве культуральной среды предлагается сбалансированный солевой раствор, обогащенный белком и содержащий буфер, подходящий условиям окружающей среды, в которых будут обрабатываться сперматозоиды. Для проведения вспомогательных репродуктивных процедур, таких как ИКСИ, ЭКО и искусственная инсеминация, необходимо, чтобы сывороточный альбумин человека был высокоочищенным и не был загрязнен вирусами, бактериями или прионами. Альбумин, специально разработанный для таких процедур, является коммерчески доступным. Для диагностических целей можно использовать



гораздо более дешевый BSA (**раздел 8.4 на стр. 263**). Если в инкубаторе содержится только атмосферный воздух, а температура составляет 37°C, среда должна быть забуференной (см. **раздел 8.4.1 на стр. 263**). При соблюдении этого требования pH культуральной среды благоприятен для выживания сперматозоидов. Выбор буферной среды зависит от конечного предназначения обработанных сперматозоидов. Например, для исследований функции сперматозоидов в целом требуется среда, поддерживающая капацитацию сперматозоидов, которая обычно содержит бикарбонат натрия (25 ммоль/л).

Сбор эякулята для BPT должен проводиться в стерильных условиях (**раздел 2.5.12 на стр. 77**). При подготовке эякулята для использования в терапевтических целях необходимо обеспечить стерильность методов и материалов.



Примечание. Хотя среда может быть приготовлена в лаборатории, следует отметить, что эффективность раствора и его безопасность невозможно полностью контролировать. Обычно предполагается, что при наличии возможности для BPT используются среды, изготовленные на коммерческой основе, протестированные и одобренные для терапевтического использования.

Ниже приводятся среды, которые можно приготовить или приобрести, однако это не означает, что они рекомендуются для терапевтического использования в рамках BPT.

5.3 Простое отмывание

Процедура простого отмывания позволяет получить большое количество сперматозоидов в случае хорошего качества образцов эякулята, но она не устраняет дебрис или лейкоциты, присутствующие в нем.

5.3.1 Реагенты

- **BWW, EBSS, sEBSS, HTF** (коммерчески доступные или см. **раздел 8.4 на стр. 263**) или другие патентованные и надлежащим образом протестированные и изготовленные среды, обогащенные предпочтительно сывороточным альбумином человека (HSA) или сывороткой, как описано ниже.
- HSA, высокоочищенный и свободный от вирусного, бактериального и прионного загрязнения и эндотоксинов.
- Обогащение HSA: к 50 мл среды добавьте 300 мг HSA, 1,5 мг пирувата натрия, 0,18 мл лактата натрия (60%-ный (v/v) концентрат) и 100 мг бикарбоната натрия.
- При необходимости, обогащение сывороткой (например, в случае использования описанной непатентованной среды): к 46 мл среды добавьте 4 мл термоинактивированной (при 56°C в течение 20 минут) сыворотки пациента, 1,5 мг пирувата натрия, 0,18 мл лактата натрия (60%-ный (v/v) концентрат) и 100 мг бикарбоната натрия.

5.3.2 Процедура

1. Тщательно перемешайте образец эякулята.
2. Разведите весь образец эякулята 1+1 (1 : 2) средой, чтобы способствовать удалению семенной плазмы.
3. Перенесите разведенную суспензию в несколько центрифужных пробирок, предпочтительно не более 3 мл в каждую пробирку.
4. Центрифугируйте при 300–500g в течение 5–10 минут.
5. Осторожно аспирируйте и удалите супернатант.
6. Ресуспендируйте смешанный осадок сперматозоидов в 1 мл среды осторожным пипетированием.
7. Центрифугируйте снова при 300–500g в течение 3–5 минут.
8. Осторожно аспирируйте и удалите супернатант.
9. Ресуспендируйте осадок сперматозоидов осторожным пипетированием в объеме среды, подходящем для окончательного предназначения, например для инсеминации.

Число отмываний для удаления семенной плазмы может быть уменьшено за счет использования меньшего числа пробирок и увеличения объема препарата в каждой пробирке. В этом случае следует увеличить центробежную силу и продолжительность центрифугирования, с тем чтобы обеспечить полное осаждение сперматозоидов, например при 500–600g в течение 8–10 минут. Обратите внимание, что центробежная сила зависит от радиуса и количества оборотов в минуту (об/мин) (расчет центробежных сил см. в **разделе 8.2.2 на стр. 253**).

5.4 Прямое всплытие

Сперматозоиды могут быть отобраны по их способности выплывать из семенной плазмы в культуральную среду. Этот метод известен как «всплытие» («swim-up»). Перед проведением процедуры всплытия эякулят предпочтительно не разводить и не центрифугировать, поскольку это может привести к пероксидативному повреждению мембран сперматозоидов (348). Таким образом, прямое всплытие сперматозоидов из эякулята является предпочтительным методом для отделения подвижных сперматозоидов (например, 45, 46). Метод прямого всплытия предполагает либо наслоение культуральной среды на разжиженный эякулят, либо формирование слоя разжиженного эякулята под культуральной средой. Затем подвижные сперматозоиды перемещаются в культуральную среду. Эта процедура приводит к получению меньшего числа сперматозоидов, чем отмывание, но позволяет отобрать их с точки зрения подвижности, и ее целесообразно проводить в тех случаях, когда процентная доля подвижных сперматозоидов в эякуляте низкая, например для ЭКО и ИКСИ.



5.4.1 Реагенты

- **BWW, EBSS** или **sEBSS** (раздел 8.4 на стр. 263), обогащенные предпочтительно HSA или сывороткой, как описано ниже.
- HSA, высокоочищенный и свободный от вирусного, бактериального и прионного загрязнения и эндотоксинов.
- Обогащение HSA: к 50 мл среды добавьте 300 мг HSA, 1,5 мг пирувата натрия, 0,18 мл лактата натрия (60%-ный (v/v) концентрат) и 100 мг бикарбоната натрия.
- Обогащение сывороткой: к 46 мл среды добавьте 4 мл термоинактивированной (при 56°C в течение 20 минут) сыворотки пациента, 1,5 мг пирувата натрия, 0,18 мл лактата натрия (60%-ный (v/v) концентрат) и 100 мг бикарбоната натрия.

5.4.2 Процедура

1. Тщательно перемешайте образец эякулята.
2. Поместите 1 мл эякулята в стерильную коническую центрифужную пробирку объемом 15 мл и осторожно нанесите на него 1,2 мл среды. В качестве альтернативного метода осторожно пипетируйте эякулят под культуральную среду.
3. Наклоните пробирку под углом около 45°, с тем чтобы увеличить площадь поверхности раздела эякулята и культуральной среды, и инкубируйте в течение 1 часа при 37°C.
4. Аккуратно верните пробирку в вертикальное положение и снимите верхний слой среды объемом 1 мл. В нем будут содержаться высокоподвижные сперматозоиды.
5. Разведите его 1,5–2,0 мл среды.
6. Центрифугируйте при 300–500g в течение 5 минут и удалите супернатант.
7. Ресуспендируйте осадок сперматозоидов в 0,5 мл среды для оценки концентрации, общей подвижности и прогрессивной подвижности сперматозоидов (раздел 2.4.6 на стр. 27 и раздел 2.4.8 на стр. 33).
8. Образец может быть использован непосредственно в терапевтических или исследовательских целях.

5.5 Прерывистые градиенты плотности

Прерывистые градиенты плотности могут быть использованы в качестве эффективного и адаптируемого метода для сбора высококачественных сперматозоидов для ВРТ. Этот метод может обеспечить надлежащий отбор подвижных сперматозоидов, свободных от других типов клеток и дебриса. Его легче стандартизировать, чем метод всплытия, и поэтому результаты получаются более стабильными. Этот метод используется для извлечения и подготовки сперматозоидов для проведения ЭКО и ИКСИ.



В рамках этого метода проводится центрифугирование эякулята в градиентах плотности, состоящих из коллоидной окиси кремния с силиновым покрытием, которые разделяют клетки только по их плотности. Наиболее широко применяется простой двухэтапный метод подготовки сперматозоидов путем центрифугирования в прерывистом градиенте плотности. Необходимо следовать рекомендациям производителей (см. 84). Подготовка сперматозоидов с помощью центрифугирования в градиенте плотности (ЦГП) обычно позволяет получить фракцию высокоподвижных сперматозоидов, свободных от дебриса, загрязняющих лейкоцитов, неполовых клеток и дегенерирующих половых клеток.

Имеется ряд коммерческих продуктов для создания градиентов плотности, пригодных для обработки эякулята. Любое отступление от рекомендаций по процедуре должно быть обосновано. Большинство сред с градиентом плотности содержат компоненты с высокой относительной молекулярной массой, которые имеют изначально низкую осмоляльность, поэтому их обычно готовят в среде, изоосмотической по отношению к жидкостям женских половых путей.

5.5.1 Реагенты и процедура

Приготовьте и используйте градиент в соответствии с инструкциями производителей, как упоминалось выше. Следует соблюдать осторожность при приготовлении больших объемов градиента, поскольку он подвержен загрязнению микроорганизмами. В случае обнаружения микроорганизмов под микроскопом градиент необходимо удалить в отходы.

5.6 Сортировка клеток с магнитной активацией (MACS)

Появление ВРТ, особенно с учетом случаев, когда требуется извлечение сперматозоидов для искусственного оплодотворения, например для проведения ИКСИ в случае бесплодия по мужскому фактору, способствовало разработке дополнительных исследований в области оптимизированного извлечения функциональных сперматозоидов без значительного повреждения ДНК.

Кокрейновский систематический обзор (358) не выявил различий в вероятности наступления клинической беременности и живорождений после применения MACS и после использования сперматозоидов, отобранных методом связывания с гиалуроновой кислотой (HA-ICSI) или с помощью других методов отбора. Кроме того, после ЦГП наблюдается повышенная фрагментация ДНК, что приводит к снижению вероятности наступления беременности у пар, прибегающих к ЭКО/ИКСИ (354).

5.6.1 Реагенты и оборудование для извлечения сперматозоидов методом MACS

- Буферный раствор **HEPES**, модифицированный **HTF**.
- Аннексин V-конъюгированные микросферы или микрогранулы.



- Набор аннексин V-конъюгированных микрогранул (Miltenyi Biotec, Huburn, CA, USA; MACS Good Manufacturing Practice (GMP) Annexin V kit, Miltenyi Biotec, Germany).
- Разделительная колонка или магнит, оснащенный железным шариком (Mini MACS, Miltenyi Biotec).
- Пробирки Эппендорфа (1,5 мл).
- Центрифуга.
- Инкубатор.

5.6.2 Процедура

1. Аликвоту эякулята объемом 0,5 мл суспендируют в буферном растворе **HEPES**, модифицированном **HTF**, который получают после отмывания сперматозоидов для удаления семенной плазмы или перед ЦГП, когда добавляется дополнительная процедура.
2. Центрифугируйте и суспендируйте осадок в 80 мкл связывающего буферного раствора с 20 мкл аннексин V-конъюгированных микросфер (Annexin V microbead kit, Miltenyi Biotec, Huburn, CA, USA) в течение 15 минут при комнатной температуре.
3. Добавьте 400 мкл связывающего раствора и поместите в разделительную колонку, и немеченые (жизнеспособные) клетки пройдут через колонку.
4. Немеченую фракцию извлекают и обрабатывают, как описано выше (359).

5.7 Подготовка образцов ВИЧ-инфицированного эякулята

Если в эякуляте присутствует вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусная рибонуклеиновая кислота (РНК) и провирусная ДНК могут быть обнаружены в свободном виде в семенной плазме и клетках, не относящихся к сперматозоидам. По результатам систематического обзора и метаанализа (360), охватывающего 11 585 циклов ВРТ с использованием отмытых сперматозоидов среди 3994 женщин из ВИЧ-дискордантных пар, 56,3% достигли клинической беременности, и у них не происходило сероконверсии без вирусной супрессии в плазме. Поскольку рецепторы ВИЧ (CD4, CCR5, CXCR4) экспрессируются только клетками, не относящимися к сперматозоидам, в качестве способа предотвращения заражения неинфицированных женщин-партнеров было предложено ЦГП в сочетании с последующим методом всплытия (361, 362), при том, что существуют и другие проверенные методы (363). Эти процедуры были разработаны для отделения инфицированных вирусом клеток, не относящихся к сперматозоидам, и семенной плазмы (в супернатанте градиента плотности) от свободных от ВИЧ подвижных сперматозоидов после всплытия (из осадка в градиенте плотности). Перед использованием подготовленные образцы необходимо протестировать методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), и для ВРТ должны использоваться только свободные от ВИЧ образцы. Несмотря на обнадеживающие результаты, пока

еще нет достаточных фактических данных, подтверждающих устранение риска инфицирования ВИЧ в результате подготовки сперматозоидов.



Примечание. Для минимизации риска перекрестной контаминации свободных от ВИЧ образцов этот метод должен использоваться только в учреждениях с безопасными условиями (364). Недавно полученные данные (365–368) свидетельствуют о том, что в дискордантных парах, в которых достигнута вирусная супрессия, передача ВИЧ партнеру незначительна или полностью отсутствует.

5.8 Подготовка сперматозоидов из ткани яичка и придатка яичка

Для сперматозоидов, извлеченных из ткани яичка и придатка яичка, требуется специальная подготовка. Типичным показанием для аспирации сперматозоидов из придатка яичка является в большей мере обструктивная азооспермия, чем дисфункция яичек. Поэтому для терапевтических целей может быть собрано относительно большое количество сперматозоидов. Аспираты из придатка яичка часто могут быть получены с минимальным загрязнением эритроцитами и другими неполовыми клетками, что делает выделение и отбор подвижных сперматозоидов из придатка яичка относительно простым. При получении большого количества сперматозоидов из придатка яичка эффективным методом их подготовки для последующего использования является ЦГП (раздел 5.4 на стр. 187). При небольшом количестве сперматозоидов можно применять метод простого отмывания (раздел 5.3 на стр. 186).

Сперматозоиды из яичка могут быть получены путем открытой биопсии (с микродиссекцией или без нее) или путем чрескожной пункционной биопсии. Образцы сперматозоидов из яичек неизменно загрязнены неполовыми клетками и большим количеством эритроцитов, поэтому для получения чистого препарата сперматозоидов необходимы дополнительные шаги. Для забора связанных в семявыносящих канальцах удлинённых сперматид (сперматозоидов из ткани яичка) необходимы ферментативные или механические методы. Сперматозоиды из ткани яичка используются для ИКСИ с учетом их незначительного количества и низкой подвижности.

5.8.1 Ферментативный метод

1. Инкубируйте ткань яичка с коллагеназой (например 0,8 мг *Clostridium histolyticum*, тип 1А на мл среды) в течение 1,5–2 часов при 37°C, перемешивая вихревым способом каждые 30 минут.



Примечание. Ферменты могут вызвать повреждение сперматозоидов, и в случае их использования они должны быть пригодны для терапевтического применения.

2. Центрифугируйте при 100g в течение 10 минут и исследуйте осадок.

5.8.2 Механический метод

1. Мацерируйте ткань яичка в культуральной среде под стеклянными покровными стеклами до получения тонкой суспензии диссоциированной ткани.
2. В качестве альтернативного способа извлеките клетки из семявыносящих канальцев с помощью тонких игл (прикрепленных к одноразовым туберкулиновым шприцам), наклоняя их параллельно дну чашки для культивирования.

5.8.3 Обработка суспензии сперматозоидов для интрацитоплазматической инъекции

1. Отмойте полученные образцы, добавив 1,5 мл культуральной среды.
2. Центрифугируйте при 300g в течение 8–10 минут.
3. Удалите супернатант и ресуспендируйте осадок в 0,5 мл свежей культуральной среды.
4. Оцените подвижность и количество сперматозоидов в осадке. (Некоторые образцы с низким числом сперматозоидов, возможно, потребуются ресуспендировать в меньшем объеме среды.)
5. Поместите каплю культуральной среды объемом 5–10 мкл в чашку для культивирования.
6. Покройте ее минеральным маслом (предварительно уравновешенным CO₂).
7. Введите 5–10 мкл суспензии сперматозоидов в культуральную среду.
8. Осторожно аспирируйте подвижные сперматозоиды, находящиеся на поверхности раздела между культуральной средой и маслом, с помощью пипетки для ИКСИ.
9. Перенесите их в каплю вязкого раствора, например, поливинилпирролидона (7–10% (100 г/л) в среде).

5.9 Подготовка образцов при ретроградной эякуляции

У некоторых мужчин при эякуляции семенная жидкость попадает в мочевой пузырь, что приводит к аспермии – отсутствию видимого эякулята. Подтверждение этой ситуации можно получить при исследовании образца мочи после оргазма на наличие сперматозоидов. Если фармакологическое лечение невозможно или не дает результатов, сперматозоиды могут быть выделены из мочи. Подщелачивание мочи, например, путем приема бикарбоната натрия, повысит вероятность того, что какие-либо сперматозоиды, попавшие в мочу, сохраняют свои характеристики подвижности (369).

5.9.1 Сбор эякулята без предварительного подщелачивания мочи

В лаборатории мужчину следует попросить:

- помочиться без полного опорожнения мочевого пузыря;
- собрать эякулят путем мастурбации в контейнер для образца; и
- снова помочиться во второй контейнер для образца, содержащий культуральную среду (для дальнейшего подщелачивания мочи).

5.9.2 Сбор эякулята с предварительным подщелачиванием мочи

Подщелачивания мочи можно добиться, выпив воду с хлоридом натрия и бикарбонатом натрия за 1–2 часа до попытки сбора эякулята. Это можно сочетать со стимуляцией альфа-1-рецепторов.

В лаборатории мужчину следует попросить:

- собрать эякулят путем мастурбации в контейнер для образца; и
- помочиться после оргазма во второй контейнер (объемом не менее 500 мл).

5.9.3 Исследование образцов антеградного эякулята и мочи после оргазма

Необходимо исследовать как эякулят, если он есть, так и образцы мочи. Поскольку может быть получен большой объем мочи, часто бывает необходимо концентрировать образец путем центрифугирования (при 500g в течение 8 минут). Ретроградный образец после концентрации и антеградный образец, если он получен, могут быть наиболее эффективно подготовлены методом центрифугирования в градиенте плотности (**раздел 5.5 на стр. 188**).

5.10 Подготовка образцов, полученных в результате ассистированной эякуляции

Семенная жидкость у мужчин с нарушенной эякуляцией или анэякуляцией может быть собрана с помощью прямой вибростимуляции полового члена или ректальной электростимуляции добавочных половых желез. В эякуляте пациентов с повреждением спинного мозга часто наблюдаются высокая концентрация сперматозоидов, снижение подвижности сперматозоидов, а также загрязнение эритроцитами и лейкоцитами. Образцы, полученные путем электроэякуляции, наиболее эффективно обрабатываются путем ЦГП (**раздел 5.5 на стр. 188**). Независимо от метода подготовки, эти типы эякулята часто содержат высокую процентную долю неподвижных сперматозоидов.



Глава 6. Криоконсервация сперматозоидов

6.1 Введение	195
6.2 Причины криоконсервации сперматозоидов.....	196
6.3 Оценка риска криоконсервации и хранения эякулята человека.....	199
6.4 Протоколы криоконсервации эякулята	202
6.5 Витрификация	208

6.1 Введение

Криоконсервация сперматозоидов является важной частью работы многих лабораторий, занимающихся исследованиями эякулята, особенно тех, которые связаны с клиниками по лечению бесплодия.

История криобиологии сперматозоидов человека берет свое начало в конце 1940-х годов. Открытие того, что глицерин защищает сперматозоиды от повреждения при замораживании, позволило использовать сперматозоиды человека, хранящиеся на сухом льду при температуре -79°C (370–372). Впоследствии стали использовать жидкий азот, а с созданием коммерческих банков спермы или скоординированных национальных служб практика криоконсервации эякулята стала быстро развиваться во многих странах (373–377).



Выживание клеток после замораживания и размораживания в значительной мере зависит от минимизации образования внутриклеточных кристаллов льда.



В настоящее время используется целый ряд протоколов криоконсервации с различными криопротекторами и процедурами замораживания. Выживание клеток после замораживания и размораживания в значительной мере зависит от минимизации образования внутриклеточных кристаллов льда. Это достигается путем использования соответствующих криопротекторов и применения таких скоростей охлаждения и нагревания, при которых количество внутриклеточной воды, подверженной образованию льда, сводится к минимуму (378–380). Если сперматозоиды находятся значительное время при температуре выше -130°C (температура перехода к стекловидной стадии), особенно в процессе размораживания, может произойти рекристаллизация с ростом потенциально разрушительных внутриклеточных кристаллов льда. Существует две категории криопротекторов: проникающие, такие

как диметилсульфоксид (ДМСО) и глицерин, и непроникающие, такие как альбумины, декстраны и цитрат яичного желтка.

Сперматозоиды человека переносят различные скорости охлаждения и нагревания. Они не очень чувствительны к повреждениям в результате быстрого начального охлаждения (холодовой шок), возможно, из-за высокой текучести мембраны, обусловленной содержанием ненасыщенных жирных кислот в липидном бислое (381). Они могут быть также более устойчивы по сравнению с другими клетками к повреждениям при криоконсервации из-за низкого содержания воды (около 50%). Тем не менее, криоконсервация оказывает неблагоприятное воздействие на функции сперматозоидов человека, особенно на их подвижность. После криоконсервации процентная доля подвижных сперматозоидов может снижаться до уровня в диапазоне от 50,6% до 30,3%, в зависимости от исследований (382). Оптимизация процесса криоконсервации, по всей вероятности, позволит минимизировать такие повреждения.

Частота наступления беременности после искусственной инсеминации донорской спермой после ее криоконсервации часто связана с качеством сперматозоидов после размораживания, временем инсеминации и, особенно, с факторами реципиента, такими как возраст, предыдущая беременность при инсеминации донорской спермой, а также нарушения овуляции и проходимости маточных труб (383). Если эякулят хранится в надлежащих условиях, то со временем явных ухудшений его качества не происходит; на сегодняшний день рождены дети после инсеминации спермой, хранившейся более 28 лет (384, 385). В отдельных случаях (например, при высоком уровне лейкоцитов в эякуляте) рекомендуется отбирать высокоподвижные фракции сперматозоидов (глава 5 на стр. 183), поскольку это может обеспечить лучшее восстановление (386).

6.2 Причины криоконсервации сперматозоидов

Можно выделить две широкие области хранения спермы человека в криобанках: хранение для собственного использования в будущем (аутологичные ВРТ) и хранение донорской спермы (гомологичные ВРТ).

Сперматозоиды могут храниться для собственного использования в будущем по разным причинам в соответствии с национальными рекомендациями (371). В частности, по рекомендации Американского общества клинической онкологии, медицинские работники должны всегда предлагать криоконсервацию спермы всем мужчинам постпубертатного репродуктивного возраста, проходящим лечение в связи с онкологическим заболеванием, поскольку это является единственным эффективным методом для таких пациентов (387). Мужчин следует также предупреждать о возможном повышенном риске генетических повреждений сперматозоидов, собранных после начала химио- или радиотерапии, и о том, что криоконсервацию спермы следует осуществлять до начала такого лечения. В некоторых случаях может потребоваться изменение процедуры криоконсервации (раздел 6.2.2).

По имеющимся на сегодняшний день данным, существенной разницы в использовании криоконсервированной или свежей спермы для ВРТ (388–390) не наблюдается, но стоит отметить, что есть данные о повышенной фрагментации ДНК после криоконсервации (391).



6.2.1 Донорская сперма

Эякулят от здоровых доноров, которые, как известно или как предполагается, фертильны, может храниться для использования в будущем. Во многих странах донорская сперма должна находиться в карантине в течение 6 месяцев, с тем чтобы можно было проверить донора на инфекции, передаваемые половым путем, и удостовериться в том, что его эякулят не содержит микроорганизмов, таких как ВИЧ. Доноры могут привлекаться клиниками или банками спермы, а их сперматозоиды используются анонимно или иным путем в соответствии с национальными руководствами и законодательством. Донорские сперматозоиды могут быть использованы для искусственной инсеминации, ВМИ, ЭКО или ИКСИ, например:

- для партнерши бесплодного мужчины, у которого нет живых сперматозоидов или удлинённых сперматид, пригодных для ИКСИ, или когда лечение не помогло или слишком дорого;
- для предотвращения передачи наследственных заболеваний;
- после повторного выкидыша, когда инсеминация донорскими сперматозоидами может привести к наступлению успешной беременности;
- для женщин, желающих родить ребенка, но не имеющих партнера-мужчины, в тех странах, где это разрешено.

Необходимо всегда соблюдать местное и национальное законодательство в отношении генетического и инфекционного скрининга.

6.2.2 Сохранение фертильности

Эякулят можно собрать и сохранить до того, как мужчина подвергнется процедуре или воздействию, которые могут нарушить его фертильность, таким как:

- вазэктомия (в случае изменения в будущем семейной ситуации или возникновения желания родить ребенка);
- лечение цитотоксическими препаратами или лучевая терапия, которые могут необратимо нарушить сперматогенез (387);
- действительная служба в опасных условиях, например в вооруженных силах (в случае смерти в странах, где допустимо деторождение после смерти отца, или возможных травм половых органов);
- смена пола с мужского на женский среди трансгендерных взрослых и подростков (392);
- травма яичек (в некоторых обстоятельствах после тестикулярной экстракции сперматозоидов, TESE) (393).



Примечание 1. Для сохранения фертильности или лечения бесплодия в идеале необходимо хранить нормальные образцы в количестве, достаточном для 10 или более инсеминаций, с тем чтобы обеспечить высокую вероятность беременности.



Примечание 2. Поскольку при применении ИКСИ для каждого ооцита требуется только один сперматозоид, целесообразно проводить криоконсервацию любых живых сперматозоидов.



Примечание 3. Сохранение эякулята, собранного до процедуры, которая потенциально может привести к стерилизации, часто имеет большое психологическое значение, поскольку дает надежду на будущее отцовство. У пациентов, которым предстоит терапия алкилирующими препаратами или лучевая терапия, эякулят должен быть собран до начала лечения из-за риска мутагенеза в сперматозоидах. Всем пациентам, нуждающимся в химио- или лучевой терапии, включая подростков (394), должна предлагаться возможность сохранения сперматозоидов.

6.2.3 Лечение бесплодия

Сперматозоиды могут храниться в целях последующего использования для ВМИ, ЭКО или ИКСИ, например в таких случаях, как:

- тяжелая олигозооспермия или интермиттирующее присутствие подвижных сперматозоидов в эякуляте (как резерв для ИКСИ) (395) или синдром Клайнфельтера (в период полового созревания), когда можно собрать образец эякулята (396);
- лечение бесплодия, эффект которого может не сохраняться, например после хирургического лечения непроходимости половых путей или лечение гонадотропинами при гипоталамо-гипофизарном гипогонадизме;
- необходимость особых методов сбора эякулята, например таких, как ассистированная эякуляция для пациентов с повреждением спинного мозга, сбор сперматозоидов в моче при ретроградной эякуляции или хирургическая экстракция из половых путей;
- невозможность собрать свежий эякулят в день проведения процедуры ВРТ среди таких пациентов, как:
 - мужчины, которые не могут присутствовать в лаборатории ВРТ в день инсеминации или испытывают трудности со сбором эякулята по психологическим причинам;
 - мужчины с необструктивной азооспермией, которым требуется экстракция сперматозоидов из ткани яичка;*
 - мужчины с повреждением спинного мозга, которым требуется экстракция сперматозоидов из ткани яичка;*
 - мужчины, которым проводятся операции вазовазостомии или вазоэпидидимостомии в связи с обструктивной азооспермией с микрохирургической аспирацией сперматозоидов из придатка яичка

или экстракцией сперматозоидов из ткани яичка для сохранения фертильности.*

* В этих случаях следует выполнять процедуру, описанную в **разделе 6.4.2 на стр. 206**.

Высказывалась также озабоченность по поводу того, что в парах с тяжелым мужским фактором бесплодия применение ВРТ со сперматозоидами партнера может быть гораздо менее успешным, чем ВРТ со сперматозоидами донора (397).

6.2.4 Минимизация передачи инфекционных болезней

Для мужчин с ВИЧ-инфекцией, контролируемой антиретровирусной терапией, образцы с невыявляемой вирусной нагрузкой могут быть сохранены для проведения ВМИ, ЭКО или ИКСИ, с тем чтобы их партнерши могли попытаться зачать ребенка при сниженном риске инфицирования ВИЧ. Вирусную нагрузку необходимо также проверять у мужчин, желающих криоконсервировать сперму, которые серопозитивны по гепатиту В или С.

6.3 Оценка риска криоконсервации и хранения эякулята человека

Криоконсервация и последующее хранение сперматозоидов человека является весьма сложным процессом, который накладывает особую ответственность и потенциальные обязательства на лабораторный персонал. При оценке рисков, связанных с криоконсервацией и хранением эякулята, необходимо рассмотреть нижеследующие вопросы.

6.3.1 Ресурсы

- Физическая безопасность сосудов, образцов и помещения для хранения, необходимая для снижения риска утраты в результате кражи или пожара, повреждения соломин, пробирок и сосудов для криоконсервации и прекращения подачи жидкого азота.
- Пригодность оборудования для предлагаемого использования.
- Система удержания и удаления азота.
- В резервуарах должна быть установлена система оповещения, сигнализирующая об уровне азота ниже определенного порога и о температуре выше определенного порога. Эта система должна быть установлена таким образом, чтобы сигнал поступал до наступления критической ситуации и передавался в центр обработки вызовов, который будет консультировать персонал банка спермы.

6.3.2 Безопасность и защита персонала

- В банке спермы всегда должны быть в наличии средства индивидуальной защиты. По возможности, в банке спермы должны одновременно находиться два человека; в противном случае персонал, находящийся снаружи, должен быть предупрежден перед входом в банк.
- Рекомендуется устанавливать системы, оповещающие о низких уровнях атмосферного кислорода и связанных с этим корректирующих действиях.

6.3.3 Риск перекрестной контаминации

Для снижения риска перекрестной контаминации инфекционными агентами образцов, находящихся на хранении (например, передача ВИЧ или вирусов гепатита В (HBV) или С (HCV) через сосуд для криоконсервации), рассмотрите следующие вопросы:

- тип контейнера для хранения (пробирки или соломины), метод запечатывания соломин (тепловой или полимерный) и использование вторичного рукава (соломина в солоmine);
- среда для хранения: жидкий азот или его пары;
- протокол и метод хранения образцов высокого риска (образцы, которые, как известно или как предполагается, содержат вирусы). В этих случаях рекомендуется, а в некоторых областях требуется использовать отдельные резервуары для положительных образцов в отношении каждого вируса;
- проведение криоконсервации для каждого пациента отдельно и дезинфекция всей поверхности в конце каждой процедуры.

Другие меры предосторожности, которые могут быть приняты для предотвращения или ограничения контаминации, если вышеуказанные меры предосторожности не могут быть обеспечены:

- стерилизация жидкого азота для предотвращения контаминации – целесообразно в случае витрификации, когда образец непосредственно погружается в жидкий азот (398);
- периодическое пополнение сосудов Дьюара или резервуаров стерильным жидким азотом и ежегодная дезинфекция резервуаров для криоконсервации;
- дезинфекция замороженных образцов перед подогревом;
- тестирование всех мужчин при сдаче эякулята на криоконсервацию на следующие вирусы и инфекции, передаваемые половым путем (или в соответствии с национальными правилами):
 - ВИЧ, типы 1 и 2 (проведение теста на нуклеиновые кислоты (NAT), который также проверяет наличие антител группы O);
 - HBV, включая тест на поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), тест на общие антитела к коровому антигену вируса гепатита В (анти-HBc) (IgG и IgM) и NAT-тест на HBV или комбинацию, включающую HBV;

- HCV, включая тест на антитела к вирусу HCV и NAT-тест на HCV;
- бледная трепонема (т.е. сифилис);
- chlamydia trachomatis (с использованием теста, предназначенного для выявления инфекции в бессимптомных популяциях с низкой распространенностью);
- гонококковая инфекция (с использованием теста, предназначенного для выявления инфекции в бессимптомных популяциях с низкой распространенностью);
- Т-лимфотропный вирус человека (HTLV), типы I и II, с использованием теста на анти-HTLV I/II;
- цитомегаловирус (CMV) с использованием теста на анти-CMV (общие и IgG и IgM).



Примечание. Для доноров спермы могут требоваться другие тесты в соответствии с национальным законодательством.

6.3.4 Безопасность замороженных образцов

- Разделите образцы и храните их в отдельных сосудах для криоконсервации и/или в разных местах для снижения риска полной утраты.
- Дважды проверяйте идентичность образцов на каждом этапе.
- Используйте надежную маркировку и идентификационные коды.
- Обеспечьте наличие процедур для регулярного аудита использования материалов и образцов, остающихся на хранении.
- После длительного использования резервуары для криоконсервации могут загрязняться. Поэтому их следует периодически дезинфицировать с помощью растворов, которые не вступают в реакцию с алюминием и сталью. Дезинфекцию рекомендуется проводить не реже одного раза в год.
- Во всех резервуарах должны быть установлены системы оповещения с датчиками пониженных уровней для контроля температуры и уровня жидкого азота. Датчики должны быть подключены к сигнализации для оповещения лабораторного персонала о возможных проблемах.

Источники: (364, 377, 399, 400).



Примечание 1. Хранение в паровой фазе, а не в жидком азоте может способствовать снижению риска перекрестной контаминации. Вместе с тем в сосудах для хранения в паровой фазе могут существовать большие температурные градиенты, зависящие от формы, загрузки и типа контейнеров для образцов. В случае хранения в паровой фазе убедитесь, что оно осуществляется в сосуде, предназначенном для этой цели и ратифицированном в соответствии с международными стандартами медицинского оборудования.



Примечание 2. Для хранения в жидком азоте доступны безопасные соломины из термосвариваемой иономерной смолы (соломины повышенной безопасности). Они защищены от протечек, бактерий и вирусов и механически устойчивы при температуре -96°C (364, 377, 400).

6.4 Протоколы криоконсервации эякулята

Существует несколько протоколов замораживания и управления банками спермы (377). В продаже имеется несколько криопротекторов. Криопротекторы подразделяются на проникающие (среди которых наиболее широко используется глицерин) и непроникающие (например, молекулы сахара и яичный желток). Можно использовать криопротекторы, содержащие или не содержащие яичный желток (в качестве разбавителей эякулята) (377). Ниже приведена подробная информация о широко используемом криопротекторе (глицерин-яичный желток-цитрат (GEYC)) и процедурах программируемого или парового замораживания.

С учетом того, что криоконсервированные сперматозоиды могут быть использованы для получения эмбрионов, все процедуры должны, по возможности, проводиться под вытяжкой класса А в классифицированном помещении (не ниже D) в соответствии с международными рекомендациями по надлежащей производственной практике. Методы и условия замораживания, не соответствующие этому стандарту, должны быть задокументированы, но, если они законны, это не является основанием для отказа в осуществлении хранения.

6.4.1 Стандартная процедура

6.4.1.1 Приготовление криопротектора GEYC



Примечание. Криопротекторы могут быть приготовлены в лаборатории, но следует отметить, что эффективность раствора и его безопасность невозможно полностью контролировать. **Обычно предполагается, что при наличии возможности используются криопротекторы, изготовленные на коммерческой основе, сертифицированные и одобренные для использования в терапевтических целях.** Это особенно актуально для криопротекторов на основе яичного желтка в связи с возможным присутствием загрязняющих веществ из корма для кур или окружающей среды. Описанные ниже процедуры весьма сложно стандартизировать до уровня, необходимого для терапевтического использования ВРТ в местных лабораториях.

Приготовление GEYC:

1. К 65 мл стерильной очищенной воды добавьте 1,5 г глюкозы и 1,3 г трехосновного дигидрата цитрата натрия.
2. Добавьте 15 мл глицерина и тщательно перемешайте.



3. Добавьте 1,3 г глицина. После того, как он растворится, пропустите раствор через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.
4. Добавьте 20 мл свежего яичного желтка (полученного предпочтительно из особых яиц, не содержащих патогенов). Для этого вымойте яйцо и удалите скорлупу. Проколите оболочку вокруг желтка и наберите содержимое в шприц (из одного яйца будет получено примерно 10 мл желтка).
5. Поместите всю суспензию на водяную баню при 56°C на 40 минут, периодически перемешивая вихревым способом.
6. Проверьте pH раствора. Если он находится вне диапазона 6,8–7,2 из-за добавления неправильных ингредиентов или неправильных количеств ингредиентов, удалите раствор и приготовьте новый.
7. На этой стадии может быть выполнен бактериологический посев для тестирования стерильности.
8. На этой стадии может быть также проведено тестирование на токсичность сперматозоидов.
9. Распределите раствор по аликвотам объемом 2 мл в стерильных условиях и храните при –70°C.
10. Используйте в течение 3 месяцев.

Криопротекторы, аналогичные GEYC, коммерчески доступны.

6.4.1.2 Добавление криопротектора в эякулят

1. Разморозьте криопротектор при комнатной температуре и перемешайте. Может быть целесообразным первоначальное размораживание при 37°C.
2. Высокая концентрация глицерина разрушительна для сперматозоидов. Поэтому важно проявлять особую осторожность при добавлении криопротектора и его перемешивании с эякулятом.
3. Добавьте один объем криопротектора GEYC к двум объемам эякулята либо капля за каплей с вихревым перемешиванием, либо аккуратным пипетированием, перемещая пипетку вверх и вниз, либо постепенно, добавляя раствор пять раз и аккуратно перемешивая в течение примерно 10 минут при комнатной температуре.
4. После добавления криопротектора GEYC в полном объеме инкубируйте смесь при 30–35°C в течение 5 минут.

6.4.1.3 Заполнение соломин эякулятом

1. Пластиковые соломины объемом 0,5 мл широко используются благодаря своим теплопроводным свойствам и простоте хранения. Для хранения больших объемов можно использовать пластиковые пробирки.

2. Аспирируйте смесь эякулята и криопротектора GEYC в пластиковые соломины для эякулята объемом 0,5 мл или поместите ее в криопробирки. Некоторые коммерческие соломины снабжены одноразовым «наполнительным наконечником», который позволяет избежать прямого загрязнения конца соломины эякулятом. Соломины можно заполнять с помощью специального вакуумного устройства или адаптера, надеваемого на их конец. Соломины наполняются до тех пор, пока жидкость не коснется ватной пробки, которая предотвращает опорожнение соломины при прекращении аспирации.

6.4.1.4 Запечатывание соломин с эякулятом

1. Оставьте воздушное пространство в 1 см в нижнем конце, постучав по боковой поверхности контейнера. При использовании наполнительного наконечника это будет сделано автоматически.
2. Запечатайте соломины с обоих концов с помощью аппарата для термосварки.
3. Вытрите насухо внешнюю поверхность контейнера, а затем простерилизуйте его 70%-ным (v/v) спиртом или другим дезинфицирующим средством.
4. Убедитесь, что соломины маркированы правильными данными о пациенте/доноре и что они правильно запечатаны с обоих концов, на этой стадии или ранее (**раздел 6.4.3 на стр. 207**).

6.4.1.5 Охлаждение и замораживание эякулята в программируемых морозильных камерах

Существуют программируемые морозильные камеры, которые контролируют подачу паров жидкого азота в морозильную камеру.

1. Поместите соломины или криопробирки в программируемый замораживатель и выполните инструкции производителя для активации программы.
2. Общая программа предусматривает охлаждение соломин на 1,5°C в минуту с 20°C до -6°C и затем на 6°C в минуту до -100°C. На это уходит примерно 40 минут. Затем в течение 30 минут температура в камере будет автоматически поддерживаться на уровне -100°C на случай задержки в переносе соломин в жидкий азот.
3. В зависимости от опыта работы в отдельных лабораториях могут использоваться другие, более сложные, процедуры (401).

6.4.1.6 Охлаждение и замораживание эякулята ручным методом

Ручные методы в меньшей мере управляемы и стандартизированы, чем метод программируемого замораживания, но они также обеспечивают приемлемые результаты. У этой процедуры есть целый ряд альтернативных вариантов.

1. Поместите соломины в морозильную камеру холодильника (-20°C) на 30 минут, а затем на сухой лед (-79°C) на 30 минут, после чего поместите их в жидкий азот (-196°C).



2. Соломины могут быть перенесены из морозильной камеры с температурой -20°C в другую морозильную камеру с температурой -70°C или в сосуд со смесью паров жидкого азота и воздуха, размещенный в узкой части небольшого контейнера с жидким азотом, при температуре от -80°C до -100°C на 10–15 минут, после чего они могут быть помещены в жидкий азот. Их можно также поместить на штатив, установленный на высоте 10–20 см над жидким азотом в большом контейнере, и оставить на 1 час для создания температурного градиента над жидким азотом.

6.4.1.7 Быстрое замораживание в парах

Быстрое замораживание в парах ручным методом может также дать приемлемые результаты.

1. Поместите соломины в пары жидкого азота на высоте около 10 см над уровнем N_2 (при -80°C) на 8–10 минут, чтобы обеспечить начальное медленное замораживание. Для стандартизации процесса можно использовать имеющиеся в продаже боксы с плавающими штативами для соломин или криопробирок, которые поддерживают фиксированное расстояние между соломинами и азотом.

2. Сразу после этого погрузите соломины в жидкий азот.

6.4.1.8 Хранение замороженного эякулята

1. Поместите замороженные соломины в пластиковые пробирки для хранения (например минибокалы, пробирки на подпорках или контейнеры для соломин) и вставьте их в более крупные бокалы для хранения.

2. Храните бокалы с соломинами в вакуумных сосудах (Дьюара) или резервуарах с жидким азотом.

6.4.1.9 Транспортировка замороженного эякулята

Замороженные сперматозоиды можно перевозить в имеющихся в продаже сухих контейнерах, охлаждаемых жидким азотом. Достаточно низкие температуры могут поддерживаться за счет испарения жидкого азота от нескольких дней до нескольких недель, в зависимости от размера контейнера.



Примечание. Необходимо обеспечить соблюдение местных, национальных и международных правил транспортировки жидкого азота и биологических образцов человека.

6.4.1.10 Размораживание замороженного эякулята

1. Перед использованием извлеките необходимое количество соломин или криопробирок из резервуара с жидким азотом или паром и незамедлительно поместите их в тепло при температуре 37°C (в инкубатор, а еще лучше в блок сухого тепла для контактного нагрева, который можно легко дезинфицировать между использованиями).

2. После полного размораживания отрежьте конец соломины стерильными ножницами и загрузите содержимое в устройство для инсеминации (для терапевтического использования) или выпустите содержимое для определения подвижности после размораживания (для проверки процесса замораживания).

3. Удалите криопротектор, добавив культуральную среду перед центрифугированием в течение 10 минут при 500g. Удалите супернатант и разведите осадок сперматозоидов в культуральной среде до надлежащего объема (402).

В случае, если пациенты решат избавиться от своего криоконсервированного эякулята, соломины и/или криопробирки должны быть извлечены и удалены в отходы в присутствии свидетеля, который может подтвердить, что это правильный материал.

6.4.2 Модифицированные протоколы замораживания образцов с олигозооспермией и хирургически извлеченных сперматозоидов

Эякулят, содержащий лишь несколько подвижных сперматозоидов, и суспензии сперматозоидов, полученные из половых путей или в результате биопсии яичка, можно хранить для последующей ИКСИ.

- Если необходимо криоконсервировать совсем малое количество сперматозоидов, требуются индивидуальные стратегии в зависимости от образца.
 - В продаже имеются специальные устройства для криоконсервации даже одного сперматозоида, хотя для многих из таких устройств требуются микроманипуляции (403). Такие устройства затем помещают в криопробирки и хранят в жидком азоте в соответствии с рекомендациями производителя.
 - При отсутствии таких устройств рекомендуется стратегия замораживания в минимальном объеме.
- Аспирированные из ткани яичка или придатка яичка жидкости, содержащие сперматозоиды, и суспензии сперматозоидов, отобранных методом всплытия или ЦГП из цельной спермы (**раздел 5.4 на стр. 187** и **раздел 5.5 на стр. 188**) и ресуспендированных в среде для приготовления эякулята, забуференной **HEPES** и **HSA** (4 мг/мл), могут быть подвергнуты криоконсервации с помощью криопротектора Тироде, содержащего глюкозу и глицерин (TGG), или коммерческого криопротектора в соответствии с инструкциями производителя.
- Для замораживания неповрежденной ткани яичка с целью получения сперматозоидов для дальнейшего использования требуются специально разработанные протоколы.

6.4.2.1 Модифицированный криопротектор (TGG)

1. К 40 мл стерильного раствора **Тироде** добавьте 5 мл стерильного исходного раствора сывороточного альбумина человека (100 мг/мл), 0,9 г глюкозы и 5 мл глицерина. Пропустите раствор через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

2. Храните в аликвотах объемом 2 мл при -70° .

О приготовлении криопротектора в лабораторных условиях см. примечание в разделе **6.4.1.1 на стр. 202**.

6.4.2.2 Процедура

1. Если объем образца превышает 2,0 мл, а подвижных сперматозоидов мало, центрифугируйте его при 1 500g в течение 5 минут при комнатной температуре.

2. Аспирируйте супернатант, с тем чтобы оставить около 1,0 мл, и ресуспендируйте в нем сперматозоиды. Определите процентную долю подвижных сперматозоидов (PR+NP); при крайне малом количестве подвижных сперматозоидов, оцените число подвижных клеток под каждым покровным стеклом.

3. Разморозьте аликвоту TGG или тест-желточного буфера (TYB) объемом 2 мл.

4. Постепенно добавьте один объем TGG или TYB к одному объему конечного препарата эякулята, периодически перемешивая.

5. Поместите препарат в соломины или криопробирки и заморозьте, как указано выше. Если соломины не заполнены полностью, накройте минибокал крышкой, с тем чтобы предотвратить всплытие соломин при замораживании.

6.4.3 Маркировка соломин/криопробирок и ведение записей

Для маркировки соломин или пробирок необходима надежная система кодирования. Используйте коды во всех лабораторных записях и компьютерных базах данных для сохранения анонимности доноров. Храните ключ к коду с идентификационными данными донора отдельно и в надежном месте. Существует множество возможных систем кодирования; важным требованием является наличие уникального кода для каждого донора или клиента. В случае клиентов/пациентов важно идентифицировать каждую соломину/криопробирку путем указания имени, фамилии, даты рождения, номера больницы, даты криоконсервации и любых других данных, требуемых в соответствии с национальным законодательством. Следующая система кодирования отвечает необходимым условиям:

- Каждому новому анонимному донору присваивается двухбуквенный код (AA, AB, AC, ..., VA, VB и т.д. до ZZ, после чего необходимо использовать новый метод).
- Для пациентов и известных доноров используется система трехбуквенных кодов: AAA, AAB и т.д.

- Каждый образец от конкретного донора обозначается номером, следующим за его личным кодом. Так, например, восьмой образец, собранный донором ВТ, обозначается ВТ-8.
- Буквенный код и номер образца должны быть написаны на каждой соломинке или пробирке черным несмываемым маркером. В качестве альтернативы используйте напечатанные этикетки с указанием имени, фамилии и даты рождения пациента и даты криоконсервации. Такие этикетки должны быть предназначены для использования в жидком азоте. Должное внимание следует уделять тому, чтобы выбранные этикетки не могли быть повреждены со временем.
- Минибокалы (или альтернативные сосуды), в которых хранятся соломинки, должны также иметь наклейки с четкой маркировкой, содержащей код и номер образца, и в них должны содержаться только образцы, полученные от данного пациента в данном случае.
- Для быстрой идентификации может быть также полезна цветовая маркировка более крупных бокалов, содержащих многочисленные образцы, и минибокалов.
- По мере использования хранящихся сперматозоидов количество соломинок или пробирок корректируется в базе данных.



Примечание. Все процедуры, связанные с идентификацией образцов доноров или пациентов, включая получение образцов, подготовку и маркировку соломинок, помещение в контейнеры и размораживание соломинок для использования или удаления, должны быть дважды проверены более чем одним сотрудником, и сведения об этой проверке должны быть зафиксированы в лабораторных записях. В идеале в любой момент времени лаборант должен обрабатывать только один образец эякулята.

Все образцы должны иметь код, позволяющий идентифицировать их во время хранения и транспортировки из банка спермы в принимающий центр.

6.5 Витрификация

Появляются данные, свидетельствующие о том, что витрификация может быть ценным методом криоконсервации эякулированных сперматозоидов (404). Принцип метода заключается в сверхбыстром замораживании небольшого объема образца при непосредственном контакте с жидким азотом, не содержащим загрязнений, что должно предотвратить образование льда и уменьшить осмотическое повреждение. Возможна также витрификация в соломинах (асептическая витрификация), при которой используется закрытая система и не требуется стерильный жидкий азот. Витрификация может быть проведена для цельной спермы или отдельных сперматозоидов с использованием как проникающих, так и непроникающих разбавителей и может быть использована для криоконсервации одного или небольшого числа сперматозоидов (405). Вместе с тем на данный момент получено ограниченное количество данных об улучшении параметров сперматозоидов после их размораживания после витрификации по сравнению с традиционными методами (406), и поэтому витрификацию сперматозоидов следует рассматривать как экспериментальную процедуру.



6.5.1.1 Протокол прямой витрификации

При витрификации в сочетании с использованием так называемых «открытых» устройств требуется прямое воздействие жидкого азота на образец, а такое воздействие создает дополнительные риски контаминации. Рекомендуется всегда использовать стерильный жидкий азот. Кроме того, эта процедура может быть опасной для лаборанта, который всегда должен использовать соответствующие средства защиты.

Материалы

- криопротекторы;
- стерильный жидкий азот;
- бокс для жидкого азота;
- небольшое ситечко для сбора витрифицированных сфер;
- криопробирки.

Метод (из документа Исаченко и др. (404))

1. После разведения равным объемом разбавителя¹⁰ эякулят, капля за каплей, непосредственно погружают в свободный от загрязнений жидкий азот, используя одноразовый контейнер.
2. Затем полученные сферы помещают в криопробирки, которые незамедлительно погружают в жидкий азот и хранят в нем.

6.5.1.2 Протокол витрификации в соломинах

При витрификации в соломинах (асептическая витрификация) используется закрытая асептическая система в виде двойных (одна внутри другой) полностью запечатанных соломин без прямого контакта с жидким азотом, и этот метод позволяет витрифицировать большой объем образца (100 мл) с большим количеством сперматозоидов (404, 407, 408). Эта процедура менее опасна для лаборанта.

Материалы

- соломины объемом 0,5 мл и 0,25 мл;
- среда для витрификации;
- бокс для жидкого азота;
- конические пробирки объемом 10 мл;
- среда для подогревания.

Метод

1. Приготовьте 1 мл витрификационной среды:

- среда для отмывания сперматозоидов или НТФ: 0,495 мл;

¹⁰ Тип разбавителя, температура криопротектора и время воздействия криопротектора на клетки имеют решающее значение и могут повлиять на эффективность процесса.

- 0,5 М сахарозы, растворенной в воде (например MP Biomedicals, Cat. 152584): 0,495 мл;
- Dextran Serum Supplement (e.g. IrvineScientific, Cat. 9301): 0,010 мл.

2. Используйте сперматозоиды (свободные от семенной плазмы), отобранные методом всплытия или путем центрифугирования в градиенте плотности в соответствии с параметрами сперматозоидов и протоколами местной лаборатории.

3. После извлечения отобранных сперматозоидов произведите подсчет сперматозоидов, сконцентрируйте их центрифугированием (8–10 минут при 300g), полностью удалите супернатант и добавьте соответствующее количество витрификационной среды для ресуспендирования осадка (рассчитывается следующим образом):

- объем суспензии для витрификации на соломинку (объемом 0,25 мл): 100 мкл
- концентрация эякулята на соломинку: $0,1\text{--}3,0 \times 10^6$ сперматозоидов

Пример:

Всего извлечено 15×10^6 сперматозоидов

Целевое количество для консервации: 3×10^6 сперматозоидов/100 мкл (объем на соломинку)

1 мл = 30×10^6 сперматозоидов

$X \text{ vol} = 15 \times 10^6$ извлеченных сперматозоидов

Следовательно, $X = 0,5$ мл витрификационной среды (0,5 мл витрификационной среды позволит получить 5×100 мкл соломин, каждая из которых содержит 3×10^6 сперматозоидов).

4. Смешайте осадок сперматозоидов с витрификационной средой непосредственно перед витрификацией (при комнатной температуре). Не рекомендуется подвергать клетки воздействию витрификационной среды в течение длительного времени.

5. Соломина объемом 0,25 мл должна быть обрезана на две трети своей первоначальной длины. Затем она располагается горизонтально, и в открытый конец с помощью пипетки набирается аликвота объемом 100 мкл. На всех последующих стадиях необходимо сохранять горизонтальное положение соломины, чтобы не потерять аликвоту.

6. Затем эта соломина вставляется в соломинку объемом 0,5 мл, которая термозапечатывается с обоих концов. Соломинку следует незамедлительно погрузить в жидкий азот на 5 секунд в горизонтальном положении с помощью пинцета и затем хранить в жидком азоте.

Процедура подогревания после витрификации

1. Приготовьте среду для подогревания.
2. Разморозьте содержимое соломин/криопробирок в среде, предварительно подогретой до $42\text{--}43^\circ\text{C}$.





Глава 7. Обеспечение качества и контроль качества

7.1	Контроль качества в андрологической лаборатории..	212
7.2	Характер ошибок при исследовании эякулята.....	215
7.3	Программа по ОК.....	218
7.4	Карты КК для числовых значений	222
7.5	Карты КК для процентных соотношений	226
7.6	Оценка Xbar- и S-карт	226
7.7	Статистические процедуры для анализа и отчетности по изменчивости результатов, полученных разными лаборантами	229
7.8	Внешний контроль качества и процедуры обеспечения качества.....	235
7.9	Частота и приоритетность процедур контроля качества ..	237
7.10	Обучение	238

Обеспечение качества (ОК) лежит в основе предоставления лабораторными службами надежных услуг пользователям – врачам и их пациентам. Контроль качества (КК) представляет собой набор инструментов, позволяющих определить, обеспечивают ли сами оценки надежные результаты, в то время как ОК является более широким понятием, охватывающим не только оценки. ОК включает в себя все процедуры, необходимые для устойчивого предоставления лабораторией надежных услуг. Поэтому ОК включает, помимо прочего, процедуры обмена информацией с пациентами и направляющими врачами, критерии принятия направлений, распределение результатов, а также рассмотрение ошибок и жалоб на все аспекты работы лаборатории.

“

Исследование эякулята является исключительно сложным и трудным для стандартизации процессом, который может приводить к значительным расхождениям в оценках числа, подвижности и морфологии сперматозоидов в разных лабораториях.

”

7.1 Контроль качества в андрологической лаборатории

Исследование эякулята является исключительно сложным и трудным для стандартизации процессом, который может приводить к значительным расхождениям в оценках числа, подвижности и морфологии сперматозоидов в разных лабораториях (9, 409–413). Такие расхождения можно устранить с помощью стандартизированных процедур и мер КК. Эти меры могут способствовать выявлению и устранению систематических ошибок и уменьшению технической изменчивости результатов.

Существует общий международный стандарт ИСО 15189 (357) для медицинских лабораторий, который определяет процедуры управления качеством деятельности лаборатории и обеспечивает поддержку для аккредитации лаборатории органом по аккредитации. В качестве дополнения к стандарту ИСО 15189 Международная организация по стандартизации (ИСО) разрабатывает технический стандарт для базового исследования эякулята, основанный на тех же принципах, что и данное руководство ВОЗ, публикация которого ожидается в 2021 г.

Программа по ОК деятельности лаборатории включает в себя систематический мониторинг и оценку различных аспектов лабораторных услуг, помещений и оборудования с целью максимального повышения вероятности того, что программа будет соответствовать установленным стандартам качества.

Некоторые определения представлены здесь:

- **Цель лаборатории (стандарт эффективности деятельности):** желаемый уровень эффективности той или иной услуги, обычно измеряемый с учетом времени и количества. Под целью подразумевается то, что должна обеспечивать лабораторная служба.
- **Показатель:** переменная, измеряющая какой-либо аспект той или иной услуги, который непосредственно связан с целями лаборатории. Она указывает, что конкретно необходимо измерить для определения того, были ли достигнуты цели.
- **Улучшение качества:** структурированный подход к анализу эффективности деятельности и применению систематических усилий по ее улучшению.
- **Внутренний контроль качества (ВКК)** измеряет изменчивость результатов лабораторных исследований. Он способствует выявлению общих случайных отклонений (оценка прецизионности), а также любых систематических и случайных различий между результатами, полученными разными сотрудниками, выполняющими исследования (**раздел 7.3.2 на стр. 219**).
- **Внешний контроль качества (ВнКК):** сравнение результатов, полученных по одному или нескольким показателям в разных лабораториях. Он способствует выявлению систематических отклонений и оценке точности. Он также известен как сличительные испытания (СИ) или внешняя оценка/внешнее обеспечение качества (ВНОК).

Ожидаемые преимущества программы по обеспечению качества деятельности лаборатории могут быть достигнуты только в том случае, если качество будет оптимальным на каждом этапе диагностического процесса.



Деятельность лаборатории по обеспечению КК начинается с внедрения точных и контролируемых процедур оценки, изложенных в данном руководстве (глава 2 на стр. 11). Помимо технических аспектов внимание следует также уделять квалификации вовлеченного в процесс персонала, то есть мониторингу эффективности деятельности.

Все лаборатории, выполняющие исследования эякулята, должны внедрить программу по ОК (раздел 7.3 на стр. 218), в которой излагаются цели методик и процедур, необходимых для обеспечения надежности, т.е. точности и достоверности результатов. В связи с широким распространением процедур юридической аккредитации в некоторых странах внедрение программ по ОК и ВНОК уже требуется в законодательном порядке. В других странах стандартизации требуют системы медицинского страхования. Хотя имеющиеся на местах ресурсы и возможности могут не позволить внедрить весь спектр процедур, существуют базовые или стандартные рутинные процедуры, которые должны контролироваться либо внутренними, либо, по возможности, внешними процедурами КК или ОК. Базовые рутинные процедуры (глава 2 на стр. 11) охватывают основные параметры сперматозоидов, касающиеся числа или концентрации, морфологии и подвижности.

Имеется более подробное практическое руководство более детализированным описанием процесса КК в лабораториях (414).

Таблица 7.1 Терминология обеспечения качества и контроля качества

Точность	Точность соответствия результата исследования истинному значению (или насколько правильным является результат)
Присвоенное значение	Оценка истинного значения (часто выведенная на основе среднего значения результатов, полученных в нескольких лабораториях) (целевое значение, консенсусное значение, условное истинное значение)
Систематическое отклонение	Отклонение результата исследования от присвоенного значения; воспроизводимые неточности, постоянно наблюдаемые в одном направлении (систематическая ошибка)
Биноминальное распределение	Теоретическое распределение, используемое для моделирования событий, разделяющихся на две категории, например на подвижные/неподвижные, жизнеспособные/нежизнеспособные
График Блэнда-Альтмана	График различий между сериями парных наблюдений относительно их среднего значения (ось x: среднее значение; ось y: различия)
Общая причина отклонений	Источник естественных отклонений, который влияет на все отдельные значения изучаемого процесса
95%-ный доверительный интервал	Интервал, рассчитанный на основе наблюдаемых данных, который включает истинное значение в 95% препаратов ($X_{\text{бар}} \pm 1,96 \times \text{стандартная ошибка (CO)}$) или $N \pm 1,96 \times \sqrt{N}$ для подсчитанных чисел)
Консенсусное значение	См. присвоенное значение
Условное истинное значение	См. присвоенное значение
Контрольная карта	График временной последовательности, отображающий серию отдельных измерений вместе с центральной линией и пределами допустимых отклонений

Точность	Точность соответствия результата исследования истинному значению (или насколько правильным является результат)
Пределы допустимых отклонений	Максимально допустимое отклонение процесса, обусловленное только общими причинами; отклонение за допустимые пределы свидетельствует о том, что на процесс могут влиять особые причины
График для статистического контроля	График, отображающий кумулятивное (добавленное) отклонение от целевого результата; инструмент для раннего предупреждения о систематическом отклонении и смещении
Смещение	Последовательные незначительные изменения значений, приводящие к изменению точности с течением времени; ср. с систематическим отклонением
Внешняя оценка качества (ВНОК)	Сравнение результатов процедур, выполненных на местах разными лабораториями, которое проводится внешним органом; способствует выявлению систематических отклонений и оценке точности
Надлежащая лабораторная практика	Набор принципов, обеспечивающих основы для планирования, проведения, мониторинга и регистрации лабораторных исследований, представления отчетности и архивирования результатов
Не выходящий за установленные предельные значения	Процесс не выходит за установленные предельные значения, если все значения находятся в пределах допустимых отклонений
Внутренний контроль качества (ВКК)	Проверки качества, оценивающие изменчивость осуществляемых в лаборатории процедур; такие проверки оценивают точность ежедневных операций; способствуют выявлению случайных отклонений (оценка прецизионности)
ИСО	Международная организация по стандартизации (www.iso.org), орган, устанавливающий международные стандарты, в том числе по качеству деятельности лабораторий
Изготовленные образцы для КК	Коммерчески доступные образцы, изготовленные и исследованные (проанализированные) в соответствии с инструкциями по производству
Выходящий за установленные предельные значения	Процесс выходит за установленные предельные значения, если измеренное значение превышает ожидаемые допустимые отклонения или находится в пределах допустимых отклонений, но демонстрирует значительную тенденцию изменения значений; такой процесс должен быть оценен
PDCA	Планирование, осуществление, проверка, корректировка (цикл Шухарта)
Пуассоновское распределение	Теоретическое распределение, используемое для моделирования подсчетов
Прецизионность	Точность соответствия результатов оценки препаратов; обычно выражается как неточность (смещение; изменчивость результатов, полученных в рамках исследования одной серии или партии, одного исследования или одной лаборатории, или результатов, полученных в ходе исследования разных серий или партий, разных исследований или в разных лабораториях); систематическое отклонение не влияет на оценку прецизионности (см. также ошибку выборки)
Проверка квалификации	Форма ВНОК, в которой внешний орган сравнивает результаты деятельности нескольких лабораторий и выдает сертификаты при достижении установленных уровней эффективности деятельности (качества)
Ошибка рандомизации	См. ошибку выборки (случайная ошибка)

Точность	Точность соответствия результата исследования истинному значению (или насколько правильным является результат)
S-карта	Контрольная карта стандартных отклонений измеренных значений с течением времени, которая используется для мониторинга единообразия процесса и точности измерений
Ошибка выборки	Ошибка при подсчете ограниченного числа сперматозоидов (обратно пропорциональна квадратному корню из числа подсчитанных сперматозоидов); ошибка выборки (%OB) – это стандартная ошибка подсчета (\sqrt{N}), выраженная в процентах от числа ($100 \times [\sqrt{N}/N]$)
Цикл Шухарта	См. PDCA
Особая причина отклонений	Источник отклонений, который является значительным, переменчивым или непредсказуемым и влияет только на некоторые отдельные значения изучаемого процесса (случайное отклонение)
Стандартные операционные процедуры (СОП)	Набор инструкций в отношении того, как должны выполняться процессы и методики
Статистическая ошибка выборки	См. ошибку выборки
Систематическая ошибка	См. систематическое отклонение
Целевое значение	См. присвоенное значение
Отклонение	Различие между отдельными результатами процесса; причина отклонения (ошибки) может быть общей или особой
X_{bar}-карта	Контрольная карта, отображающая отклонения средних значений измеренных величин с течением времени, которая используется для мониторинга изменчивости процесса и обнаружения отклонений от целевых значений (оценка точности)
График Юдена	График значений одного образца, отображенных в зависимости от значений другого образца

7.2 Характер ошибок при исследовании эякулята

В данном разделе рассматриваются вопросы контроля изменчивости, обусловленной техническими факторами (биологическая изменчивость в основном обсуждается в **главах 2 и 3**).

Для управления процедурами КК требуется понимание источников и величины ошибок измерения. Для любого измерения характерна определенная степень погрешности, величина которой может быть охарактеризована доверительным интервалом с верхней и нижней границами. Целью процедур КК является минимизация этих отклонений, которые в противном случае могут приводить к ошибкам в оказании медицинской помощи и лечении пациентов. При ВКК основное внимание уделяется расхождению (изменчивости) оценок, в то время как при ВНОК – точности (правильности) лабораторных оценок. Такие меры по обеспечению качества способствуют тому, чтобы результаты были более надежными, достоверными и полезными для врачей и исследователей, а также безопасными для оказания медицинской помощи и лечения пациентов.

7.2.1 Допустимое отклонение (принятая случайная ошибка)

Всегда будет существовать некоторый уровень или степень допустимого отклонения, выраженный в виде приемлемого диапазона значений (в пределах нижней и верхней границ диапазона). Этот диапазон обычно определяется путем расчета доверительного интервала (ДИ). ДИ – это статистически рассчитанный диапазон. Наиболее часто используется 95%-ный ДИ, при котором статистическая вероятность того, что истинное значение находится в пределах этого интервала, составляет 95%. В зависимости от количества наблюдений 95%-ный ДИ часто превышает стандартное отклонение (СО) примерно в два раза. СО – это показатель отклонения повторных оценок от среднего значения оценок. Для сравнения изменчивости, например между образцами с высокой и низкой концентрацией, может быть полезен коэффициент изменчивости (КИ). КИ рассчитывается путем деления СО на среднее значение оценок и обычно выражается в процентах (обратите внимание, что, когда среднее значение близко к нулю, КИ будет очень высоким (СО делится почти на ноль) и практически бесполезным).

Если диапазон между верхней и нижней границами узкий, измерение можно классифицировать как точное. Узкий диапазон является результатом низкой изменчивости между повторными оценками. Если исследование дает результат, близкий к действительному, или истинному, значению, результат является точным (или правильным). Точность характеризуется разницей между наблюдаемым результатом и истинным результатом.

Ошибки могут быть классифицированы как случайные или систематические.

7.2.1.1 Случайные ошибки

Случайные ошибки приводят к результатам, отклоняющимся от ожидаемого истинного значения в сторону повышения или понижения. Причиной случайных ошибок часто бывают различия, связанные со считыванием данных или формированием выборки, и они могут быть оценены с помощью повторных измерений, проводимых в одном и том же образце одним и тем же сотрудником с использованием одного и того же оборудования или всеми сотрудниками, выполняющими конкретную оценку с помощью всего оборудования, используемого в лаборатории для данной оценки. Ожидается, что значения не должны значительно отличаться друг от друга.

7.2.1.2 Систематические ошибки

Систематические ошибки, называемые также «систематическим отклонением», обнаружить сложнее. Систематические ошибки приводят к неправильным результатам, как правило, слишком низким или слишком высоким. Они возникают из-за факторов, которые влияют на результат последовательно в любом направлении, но не увеличивают изменчивость при повторной оценке того же образца эякулята. Поэтому систематические ошибки не выявляются при повторных измерениях.



7.2.2 Статистическая ошибка выборки

Даже если эякулят макроскопически хорошо перемешан, для распределения сперматозоидов в эякуляте, а также в фиксаторе или среде все равно характерна некоторая случайная изменчивость. Поскольку с технической и практической точки зрения подсчитать сперматозоиды во всем эякуляте невозможно, измерения ручным методом или с помощью компьютера могут проводиться только в отобранной, но, как предполагается, репрезентативной части всего образца. Проблема заключается в том, насколько хорошо аликвота (образец), отобранная из эякулята (или суспензии сперматозоидов), отражает ситуацию во всем эякуляте. Изменчивость выборки, возникающая при отборе фиксированного объема (для оценки концентрации) или фиксированного числа сперматозоидов (для классификации подвижности, морфологии или жизнеспособности), представляет собой случайную ошибку, обычно называемую (статистической) ошибкой выборки. Некоторые часто используемые термины в этой области приведены в **таблице 7.1 на стр. 213**.

7.2.3 Минимизация статистической ошибки выборки

Измерение всего образца невозможно. Другим вариантом может быть исследование меньших и, как предполагается, репрезентативных частей образца в большом числе аликвот. Поскольку для этого потребуется слишком много времени и усилий, этот вариант также не представляется возможным. Поэтому необходимо найти баланс между высокой статистической прецизионностью (надежностью результата) и фактическим временем и усилиями, необходимыми для ее достижения. Рекомендации в отношении базового исследования эякулята, приведенные в данном руководстве, включают несколько пунктов (**глава 2**), касающихся путей достижения приемлемого баланса между объемом работы и надежностью результатов:

- использование пипеток с прямым вытеснением при отборе точного объема аликвот эякулята для разведения при оценке концентрации сперматозоидов;
- обеспечение надлежащих разведений (иммобилизация сперматозоидов) и объема счетной камеры (точный объем, который оценивается) для надежной оценки концентрации сперматозоидов;
- оценки концентрации и подвижности сперматозоидов в аликвотах с проведением сравнений для снижения риска случайных ошибок из-за ненадлежащей репрезентативности аликвот;
- обеспечение достаточной глубины влажного препарата для беспрепятственной подвижности сперматозоидов; и
- подсчет достаточного числа сперматозоидов (400 для оценки подвижности и концентрации; 200 для оценки жизнеспособности и морфологии) для ограничения воздействия случайного распределения.

Если в лаборатории определена статистическая ошибка выборки, ее обычно представляют с доверительными интервалами, устанавливаемыми, как правило, на уровне 95% (с верхней и нижней границами диапазона). Это означает, что существует 5%-ная вероятность того, что правильные результаты не будут находиться в пределах «приемлемого диапазона» только из-за случайного отклонения. Если правильный результат отклоняется по этой

причине, то повторная оценка будет излишней. Обоснование заключается в том, что большинство отклоненных результатов, как ожидается, вызваны ошибками выборки. Во многих случаях частотность излишних повторных оценок может быть приемлемой. В некоторых случаях для снижения частотности излишних повторных оценок (примерно до 1% и 0,2% соответственно вместо 5%) могут быть выбраны более широкие пределы (например на уровне, превышающем стандартное отклонение в 2,6 или 3 раза вместо обычного превышения в 2 раза), но при этом следует учитывать повышенный риск допущения большего количества ошибок.

7.3 Программа по ОК

Стандарт ИСО 15189 содержит подробную информацию об управлении качеством деятельности лаборатории (357). Важным аспектом обеспечения соответствия стандарту и достижения приемлемых результатов является разработка и осуществление непрерывной программы по ОК. В рамках этой программы на регулярной основе проводятся мониторинг и оценка качества и обоснованности данных и услуг, предоставляемых лабораторией. Она обычно включает в себя управление, администрирование, статистический анализ, а также профилактические и корректирующие действия. Программа может предусматривать непрерывный мониторинг, который позволяет не только обнаруживать и устранять проблемы, но и принимать меры для предотвращения их возникновения. Программа по ОК должна быть изложена в руководстве по качеству, содержащем стандартные операционные процедуры (СОП), подробный набор инструкций в отношении различных процессов и методик, используемых в лаборатории. С этими инструкциями связан ряд форм и документов, включая, например, направления на исследования, формы отчетов о лабораторных работах и информационные листки для пациентов и направляющих врачей. В руководстве по качеству излагаются организационная структура лаборатории с перечислением навыков (обучение), необходимых на различных должностях (должностные обязанности), а также расписание совещаний персонала, выполняющего исследования, с руководителями и планы непрерывного образования, развития и обучения сотрудников.

7.3.1 Руководство по лабораторным процедурам

В руководстве должны быть описаны процедуры, которые регулярно выполняются в лаборатории. Изложенные в письменной форме СОП должны строго соблюдаться всеми сотрудниками лаборатории. Они должны быть также включены во внутренние программы обучения и ориентации технического персонала лаборатории и служить важным справочным материалом во время выполнения нерутинных процедур и при поиске и устранении проблем в процессах, которые не приводят к приемлемым результатам.

Основные документы охватывают направления на исследования, процедуры информирования пациентов, расписание приема пациентов, забор образцов, выполнение исследований, сообщение результатов исследований, процедуры проверки качества, обучение новых сотрудников лаборатории, тестирование, мониторинг и техническое обслуживание оборудования, использование контрольных карт и процедуры действий в случае, если значения на этих картах указывают на какую-либо проблему (результаты, выходящие за установленные предельные значения), а также интерпретацию результатов исследований.



СОП должны охватывать процедуры проверки надлежащего рабочего состояния всего оборудования, включая рутинную проверку работы, графика и журнала калибровки, а также документации по техническому обслуживанию научного оборудования, такого как микроскопы, центрифуги, пипетки, весы, морозильники, холодильники и оборудование, применяемое при чрезвычайных ситуациях (например для промывания глаз и принятия душа). Основным методом заключается в ведении журнала для каждой единицы оборудования, в котором регистрируются все регулировки и калибровки с использованием контрольных перечней или инструментов мониторинга. Эти записи полезны в тех случаях, когда лабораторные процедуры начинают давать результаты, выходящие за установленные предельные значения.

7.3.2 Внутренний контроль качества

ВКК позволяет отслеживать прецизионность, т.е. то, насколько воспроизводимы результаты (минимизация случайных отклонений), и, таким образом, с учетом результатов, выходящих за установленные предельные значения, указывает на то, что в проведении исследования могут быть ошибки или проблемы. Выполняемая процедура КК зависит от оценки, которую необходимо отслеживать или контролировать. Оценки, включающие процессы разведения, пипетирования или повторного использования камер, или оценки, состоящие из целого ряда этапов, требуют регулярных или более частых проверок, в то время как оценки фиксированных предметных стекол или видеозаписей могут проверяться реже, поскольку такие оценки включают меньше этапов, на которых могут происходить ошибки.

Практический способ осуществления ВКК заключается во включении процедур и образцов для ВКК в регулярную деятельность лаборатории и в проведении мониторинга результатов этих процедур с помощью карт для КК. Таким образом ВКК становится частью рутинной лабораторной работы и проводится в соответствии с установленными местными или региональными стандартами. Важно, чтобы к образцам для КК не применялся особый подход и чтобы их исследование проводилось в рамках рутинной работы лаборатории. Типы материалов для ВКК, используемых для мониторинга отклонений оценок, которые выполняются одним сотрудником (имеется в виду согласованность при считывании показаний в отношении одного и того же типа образцов одним сотрудником) и несколькими сотрудниками (имеется в виду согласованность при считывании или интерпретации показаний в отношении одного и того же образца двумя или более сотрудниками), могут быть приобретены из коммерческих источников или изготовлены в лаборатории. У каждого подхода есть свои преимущества и недостатки.

7.3.2.1 Приобретенные образцы для КК

Существуют коммерчески доступные образцы для ВКК, которые поставляются с целевым значением и, желательно, с допустимыми пределами приемлемых характеристик, установленных для данного продукта. Преимущество таких образцов заключается в возможности оценки как точности, так и прецизионности. Изменчивость результатов исследования эякулята в лаборатории можно сравнивать с изменчивостью результатов применительно к образцам из одобренного источника. При наличии таких образцов лаборатория могла бы составить свою собственную контрольную карту для оценки прецизионности



и использовать рекомендованный производителем диапазон для оценки точности (415), а отдельные центры могли бы даже установить более жесткие уровни значений. Недостатками приобретенных образцов для ВКК являются их высокая стоимость и тот факт, что они не являются общедоступными. Необходимо также учитывать аспекты стабильности образцов во время транспортировки и хранения. Следует указать, каким образом были получены целевые значения, указанные производителем (множественные оценки, CASA, консенсусные значения, усеченные средние и т.д.), если это предусмотрено.

7.3.2.2 Изготовленные в лаборатории образцы для КК

Преимуществами изготовленных в лаборатории образцов для ВКК являются снижение затрат, обобщаемость на местном уровне, а также тот факт, что образцы могут быть изготовлены специально для конкретных потребностей лаборатории. Кроме того, эти образцы не будут распознаваться как отличающиеся от обычных образцов. Можно приготовить большое число образцов, охватывающих широкий диапазон результатов, и хранить их в течение длительного времени. Их недостатком является то, что целевые значения неизвестны, что может привести к формированию долговременной совокупности систематических отклонений или ошибок. Рекомендуется, а иногда и требуется, иметь контрольные образцы для оценки среднего диапазона значений (например концентрация сперматозоидов 50×10^6 /мл), а также критического диапазона значений (например концентрация сперматозоидов менее 15×10^6 /мл). Повторные оценки образца могут позволить получить среднее значение, близкое к истинному значению для данного материала.

7.3.2.3 Хранящиеся образцы (приобретенные или изготовленные в лаборатории)

Хранящиеся образцы эякулята могут использоваться в программах ВКК для оценки концентрации и морфологии сперматозоидов. Их преимущество заключается в том, что целевое значение известно (для приобретенных образцов), предоставлено (программами ВКК) или установлено по результатам нескольких оценок (для материала, изготовленного в лаборатории), что позволяет обнаруживать систематические ошибки в ходе повторных оценок.

Концентрация сперматозоидов

Образцы эякулята с разной концентрацией сперматозоидов могут быть разведены и сохранены. Хранящиеся образцы могут иметь широкий диапазон характеристик – от образцов идеального или отличного качества до образцов низкого качества и образцов, трудных для оценки. Инструкции по приготовлению и хранению суспензий неагглютинированных сперматозоидов для КК оценки концентрации сперматозоидов см. в **разделе 8.6.3 на стр. 278**.

Морфология и жизнеспособность сперматозоидов

Для морфологической оценки можно использовать предметные стекла с высушенными на воздухе фиксированными мазками эякулята или с фиксированными и окрашенными мазками эякулята (**раздел 2.4.9.1 на стр. 50**), а для оценки жизнеспособности – мазки, окрашенные эозином-нигрозином (**раздел 2.4.7 на стр. 30**). Мазки должны быть отобраны из обычных лабораторных образцов и исследованы со скрытыми идентификационными кодами (с учетом соображений, изложенных в разделе **Морфологическая**

классификация сперматозоидов на стр. 57). Образцы следует готовить из эякулята с хорошими, средними и плохими характеристиками. Предметные стекла можно использовать повторно, но их качество необходимо время от времени оценивать. Лучше всего использовать широкий спектр предметных стекол, с тем чтобы исключить возможность того, что сотрудники начнут распознавать некоторые предметные стекла и менее строго подходить к их оценке, что может привести к неправильным результатам.

О том, как подготовить предметные стекла для КК морфологической оценки см. **раздел 8.6.4 на стр. 281**. Если предметные стекла подготовлены и хранятся надлежащим образом, они остаются стабильными в течение многих месяцев или даже лет. Различные наборы предметных стекол могут чередоваться или частично перемешиваться при переходе от одного набора КК к другому.

Подвижность сперматозоидов

Для КК можно использовать видеозаписи образцов на кассетах, CD, DVD или общих носителях, которые сделаны в клиниках, содержатся в наборах для ВНОК или специально изготовлены. Видеозаписи должны быть сделаны при тех же уровнях увеличения и разрешения, которые используются при исследовании реальных образцов под микроскопом. Использование для всех ежедневных рутинных оценок тех же уровней увеличения и контрастности для камеры микроскопа и монитора, которые использовались при видеозаписи, повышает уровень достоверности видеозаписей для КК.

О том, как делать видеозаписи для КК оценок подвижности см. **раздел 8.6.2 на стр. 273**.

7.3.2.4 Свежие образцы для КК (приготовленные в лаборатории)

Простой метод ВКК заключается в том, что один или несколько лаборантов повторно считывают показатели или производят измерения применительно к отдельным аликвотам образца эякулята. Повторные оценки должны проводиться так же, как и обычные исследования эякулята. Эта форма КК может быть применена к оценкам концентрации, морфологии, жизнеспособности и, в некоторой степени, подвижности сперматозоидов (см. ниже). Субъективный характер оценок агглютинации и агрегации, изменчивость результатов теста на смешанную антиглобулиновую реакцию (416), а также необходимость использования живых гамет и положительного контроля затрудняют КК в отношении этих исследований.

ВКК оценок подвижности сперматозоидов в свежих образцах представляет особую проблему, поскольку подвижность часто снижается со временем и, следовательно, должна оцениваться в первую очередь – и примерно в одно и то же время – всеми лаборантами в рамках программы КК. Следовательно, результаты измерений будут ниже в тех образцах, которые считываются через некоторое время или по прошествии длительного времени после взятия образца. Препараты на предметных стеклах с помещенными на них покровными стеклами, предназначенные для определения подвижности, остаются стабильными в течение всего лишь нескольких минут, поэтому можно также использовать камеры с фиксированной глубиной, которые могут оставаться стабильными в течение 30 минут, при условии, что оценки не проводятся по прошествии длительного времени после эякуляции и при разных температурах. Использование сдвоенного микроскопа или микроскопа

с камерой, соединенной с одним или несколькими мониторами, позволяет нескольким техническим сотрудникам одновременно оценивать одно и то же поле одного и того же препарата. Это особенно полезно на стадии начального обучения. На мониторе можно разместить ацетатную сетку, с тем чтобы имитировать окулярную сетку, используемую при исследовании подвижности в реальном времени (**раздел 8.6.2 на стр. 273**).

Лаборатории, использующие системы CASA, должны следовать процедурам производителей для проведения КК. Это часто включает воспроизведение сохраненных изображений движущихся сперматозоидов, которые помечены как плавающие с определенной скоростью.

7.4 Карты КК для числовых значений

В этом разделе изложены способы отображения и анализа числовых значений, прежде всего в отношении «непрерывных данных» (в основном подсчет сперматозоидов). Для отображения относительного содержания необходимо использовать несколько иные методы.

Создание и интерпретация так называемых контрольных карт является неотъемлемой частью ОК в лаборатории. Для получения надлежащим образом организованного и простого для понимания отображения данных КК существует ряд графиков, или карт. Разные графики имеют разные преимущества, и при их выборе следует учитывать характер проблемы, связанной с точностью, прецизионностью или ошибками, а также имеющийся материал. Если лаборатории не хватает компетенции в области статистики и интерпретации результатов, необходимо обратиться к внешним специалистам, с тем чтобы обеспечить мониторинг соблюдения лабораторных стандартов на основе использования системы непрерывной оценки качества. Лежащие в основе статистические теории и расчеты могут быть сложными, но сами графики довольно просты для понимания и интерпретации.

7.4.1 X_{bar} -карта

Одной из карт, которые можно использовать, является X_{bar} -карта, предназначенная в первую очередь для обнаружения результатов, значительно отличающихся от целевого значения, или для выявления общего увеличения изменчивости. Систематические ошибки могут быть обнаружены путем последовательной оценки одних и тех же образцов. Проводятся повторные оценки образца, и среднее значение отображается в зависимости от времени или исследуемой контрольной суспензии. Необходимо использовать хранящиеся образцы, поскольку данная процедура зависит от знания истинного, или целевого, значения, которое может быть предоставлено производителем (приобретенные образцы) или программой ВНОК или оценено (по результатам многочисленных оценок материала).

X_{bar} -карта представляет собой разновидность графика Шухарта, который используется для мониторинга средних значений, полученных в результате повторных исследований постоянного числа контрольных образцов. Например, в 10 суспензиях для ВКК (все приготовлены из одного препарата) подсчет сперматозоидов проводится всеми сотрудниками, выполняющими оценки данного типа. Для каждой из суспензий рассчитывается среднее значение

отдельных оценок. Затем строится график средних значений по 10 суспензиям (рис. 7.1). Рассчитываются целевое значение (X_{bar} , среднее из средних значений), предупредительные границы и пределы, при выходе за которые необходимо вмешательство (табл. 7.2). Эти пределы основаны на изменчивости оценок и числе лиц, выполняющих оценки, и выражаются как верхние и нижние пределы по отношению к X_{bar} .

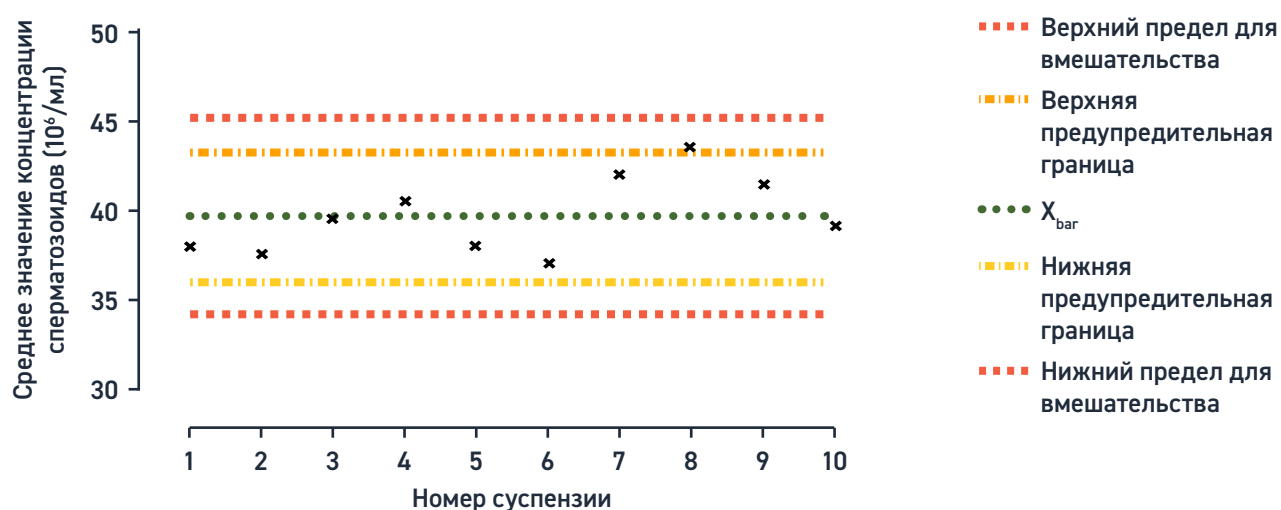
Таблица 7.2 Расчеты значений для X_{bar} -карты

Концентрация сперматозоидов оценена четырьмя андрологами (A–D) в 10 суспензиях для КК, приготовленных из одного препарата для ВКК. Предупредительные границы (A_2) и пределы, при выходе за которые необходимо вмешательство (A_3), представлены в таблице 7.3.

Сотрудник	Суспензия									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	38	35	40	34	38	36	44	43	39	43
B	42	36	42	40	40	40	43	43	46	40
C	38	43	40	51	38	33	39	45	35	39
D	34	36	36	37	36	39	42	43	46	34
Среднее значение	38,0	37,5	39,5	40,5	38,0	37,0	42,0	43,5	41,5	39,0
CO	3,27	3,70	2,52	7,42	1,63	3,16	2,16	1,00	5,45	3,74
X_{bar}	39,7									
S	3,40									
Предупредительные границы					X_{bar}	A_2	S_{bar}			
Верхняя	43,3	$X_{\text{bar}} + (A_2 \times S_{\text{bar}})$			39,7	1,085	3,40			
Нижняя	36,0	$X_{\text{bar}} - (A_2 \times S_{\text{bar}})$			39,7	1,085	3,40			
Пределы для вмешательства					X_{bar}	A_3	S_{bar}			
Верхний	45,2	$X_{\text{bar}} + (A_3 \times S_{\text{bar}})$			39,7	1,628	3,40			
Нижний	34,1	$X_{\text{bar}} - (A_3 \times S_{\text{bar}})$			39,7	1,628	3,40			

Таблица 7,3 Факторы, необходимые для расчета предупредительных границ и пределов для вмешательства для X_{bar} -карты

Число лаборантов (n)	Предупредительная граница (A_2)	Предел для вмешательства (A_3)
2	1,772	2,659
3	1,303	1,954
4	1,085	1,628
5	0,952	1,427
6	0,858	1,287
7	0,788	1,182
8	0,733	1,099
9	0,688	1,032
10	0,650	0,975

Рис. 7.1 X_{bar} -карта на основе данных из таблицы 7.1

По сравнению с S-картой X_{bar} -карта менее чувствительна в определении значительной изменчивости результатов лаборантов (раздел 7.4.2).

7.4.2 S-карта

S-карта позволяет определить значительную изменчивость результатов лаборантов. Для каждого оцениваемого раствора сперматозоидов проводятся повторные оценки, и строится график стандартного отклонения. Поскольку все образцы для КК взяты из одного и того же хранящегося пула, различий между образцами не ожидается, поэтому любые значительные различия между результатами лаборантов могут свидетельствовать о систематическом отклонении в оценке, выполненной одним или несколькими сотрудниками.

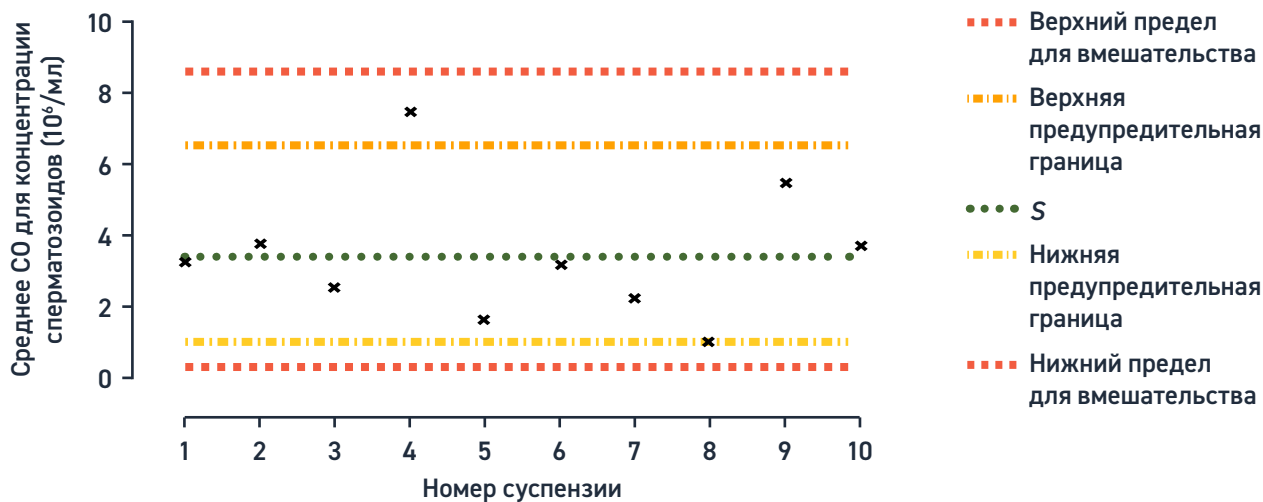
В отличие от X_{bar} -карты на график наносятся значения CO (стандартное отклонение) по результатам оценок 10 суспензий (рис. 7.2). Целевым значением является среднее CO в отношении всех суспензий – в данном

примере $3,40 \times 10^6/\text{мл}$. В соответствии с X_{bar} на S-карту наносятся пределы допустимых отклонений. Однако предупредительные границы и пределы, при выходе за которые необходимо вмешательство, рассчитываются иначе, чем на X_{bar} -графиках (таблица 7.4). Результаты, которые выходят за нижние пределы на S-карте, свидетельствуют о неожиданно малой изменчивости, что может указывать на реальное улучшение уровня согласованности между результатами лаборантов или, в худшем случае, на ненадлежащее обращение с данными.

Таблица 7.4 Расчет предупредительных границ и пределов для вмешательства для S-карты

Число лаборантов (n)	Пределы допустимых отклонений и число лаборантов			
	Нижний предел для вмешательства ($s_{0,999}$)	Нижняя предупредительная граница ($S_{0,975}$)	Верхняя предупредительная граница ($S_{0,025}$)	Верхний предел для вмешательства ($S_{0,001}$)
2	0,002	0,039	2,809	4,124
3	0,036	0,18	2,167	2,966
4	0,098	0,291	1,916	2,527
5	0,160	0,370	1,776	2,286
6	0,215	0,428	1,684	2,129
7	0,263	0,473	1,618	2,017
8	0,303	0,509	1,567	1,932
9	0,338	0,539	1,527	1,864
10	0,368	0,563	1,495	1,809
Предупредительные границы	$\times 10^6/\text{мл}$			n
Верхняя	6,51		$S \times s_{0,025}$	4
Нижняя	0,99		$S \times s_{0,975}$	4
Пределы для вмешательства				
Верхний	8,59		$S \times s_{0,999}$	4
Нижний	0,33		$S \times s_{0,999}$	4

Рис. 7.2 S-карта концентрации сперматозоидов



7.5 Карты КК для процентных соотношений

В отличие от КК для непрерывных или числовых данных для расчета пределов допустимых значений результатов, касающихся категорий или классов, должны применяться другие методы. В случае, когда сперматозоиды делятся на два или более классов (например, нормальная или аномальная морфология, четыре класса подвижности, живые или мертвые), стандартная ошибка расчетной процентной доли в пределах класса зависит от истинной, но неизвестной процентной доли, а также от числа подсчитанных сперматозоидов (N). Целевая процентная доля (p) рассчитывается как среднее значение повторных оценок одного и того же контрольного образца. Стандартная ошибка (изменчивость) для процентной доли в пределах от 20% до 80% может приближаться к $\sqrt{p(100-p)/N}$. Подробнее см. в документе Кустера и др. (417). Хотя СО отдельных показаний должно быть близко к этим значениям, среднее СО – S_{bar} – будет превышать 2,5% из-за дополнительных расхождений в результатах отдельных лаборантов. В этом случае целью будет снижение S_{bar} .

7.6 Оценка X_{bar} - и S-карт

Обеспечение надлежащего соответствия X_{bar} - и S-картам крайне важно, поскольку они могут дать важную информацию о качестве услуг, предоставляемых лабораторией. Кроме того, такие карты часто служат основой для сертификации лабораторий многими учреждениями.

Сотрудники лаборатории вместе с руководителем должны анализировать контрольные карты. Лучше всего это делать на регулярных совещаниях по вопросам обеспечения качества с участием персонала и руководителя, поскольку надлежащее качество достигается в результате коллективной работы на основе совместной оценки и обсуждения результатов деятельности лаборатории. Если пределы допустимых значений неприемлемы, следует провести систематическую оценку всей процедуры для определения возможных источников отклонений.

7.6.1 Как распознать значения, выходящие за установленные пределы?

Существуют базовые руководства по мониторингу процедур КК (414). Карты КК следует рассматривать в свете этих руководств и при необходимости принимать соответствующие меры. Существуют разные правила для признания того или иного метода выходящим за установленные предельные значения, и наиболее важные из них приведены в таблице 7.5. На практике принято использовать первое и последнее из этих правил. Первое правило (один результат находится за пределами, при выходе за которые необходимо вмешательство) является самым простым. Оно может указывать на внезапный большой сдвиг в процессе. Последнее правило (восемь последовательных результатов находятся по одну сторону от среднего значения) привлекает тем, что оно просто в применении и чувствительно к постепенным сдвигам и тенденциям, которые могут быть упущены при применении первого правила.

Если образец для КК «забракован», то при расследовании возможных причин следует руководствоваться чувствительностью (способность сообщать истинные и правильные значения результатов исследования) сигнальной системы к различным типам ошибок (случайным или систематическим) (таблица 7.5). Руководитель лаборатории должен регулярно проверять результаты КК.

Таблица 7.5 Основные правила контроля для карт КК

Правило контроля	Указанная ошибка
Один результат находится за пределами, при выходе за которые необходимо вмешательство	случайная
Две из трех точек лежат за пределами, при выходе за которые необходимо вмешательство	систематическая
Четыре из пяти точек лежат за предупреждающими границами	систематическая
Оба из двух последовательных результатов находятся либо выше, либо ниже верхней/нижней предупредительной границы	систематическая
Один из двух последовательных результатов находится выше, а второй – ниже верхней/нижней предупредительной границы	случайная
Все восемь последовательных результатов находятся либо выше, либо ниже среднего значения	систематическая

7.6.2 Причины появления значений, выходящих за установленные пределы

Сигналы, полученные в результате процедуры КК, должны быть тщательно оценены всеми сотрудниками для выявления любых ошибок, которые могли привести к значениям, выходящим за установленные пределы. Возможные ошибки (с примерами) включают следующие:

- ненадлежащее перемешивание образца (характерно для вязких и агглютинированных образцов);

- стресс лаборанта (например, неправильный отбор образцов или ошибки при записи);
- небрежное техническое выполнение (например, небрежное пипетирование или неаккуратные действия при подготовке предметного стекла или камеры) (**раздел 7.10 на стр. 238**);
- недостаточный уровень обучения (например, систематические различия в результатах при определении сперматозоидов для подсчета, при классификации сперматозоидов с нормальной морфологией, при оценке розовых и белых головок или закрученных хвостов сперматозоидов для определения их жизнеспособности и при выявлении подвижных сперматозоидов или систематические отклонения в результате последовательных ошибок при расчетах) (**раздел 7.10 на стр. 238**);
- изменения в состоянии инструментария (например, изношенные или некалиброванные автоматические пипетки, которые могут снижать воспроизводимость при отборе и разведении образцов; разрегулированные микроскопы, что может приводить к снижению оптической прозрачности и препятствовать правильной оценке жизнеспособности или морфологии; неточные весы или измерительные цилиндры) (**раздел 8.6.5 на стр. 283**);
- ухудшение качества образцов для КК (на основе стандартизированных критериев);
- замена оборудования, в частности пипеток и счетных камер; и
- изменения процедур и окружающих условий.

7.6.3 Меры в связи с появлением значений, выходящих за установленные пределы

При выходе результатов за установленные пределы следует зафиксировать вероятные причины и предпринятые корректирующие действия. Если проблема не является очевидной, может потребоваться повторное исследование образцов для КК, с тем чтобы убедиться в том, что первый результат не был ошибочным. Если результат КК по-прежнему выходит за установленные пределы, то прежде, чем проводить дальнейшие исследования, необходимо найти и устранить причину или источник ошибки.

Для этого необходимо сделать следующее:

1. Создайте блок-схему всего процесса, шаг за шагом. В этом процессе могут помочь **СОП и таблицы 7.14–7.17 на стр. 240**.
2. На основе блок-схемы определите области потенциальных отклонений, установите возможные причины и разработайте план по уменьшению отклонений.

3. Соберите дополнительные данные, составьте новые контрольные карты и проанализируйте их, с тем чтобы определить, является ли изменчивость приемлемой для данной процедуры. Эта последовательность выявления проблемы, разработки и проверки гипотезы, а также переоценки процесса известна как цикл планирования, осуществления, проверки и корректировки (plan, do, check, act) (PDCA).

7.7 Статистические процедуры для анализа и отчетности по изменчивости результатов, полученных разными лаборантами

Процедуры КК, основанные на оценке свежих образцов эякулята, аналогичны процедурам, применяющимся к хранящимся образцам, и позволяют оценивать изменчивость результатов, полученных разными лаборантами. Несмотря на имеющееся сходство, существуют и различия. При исследовании свежих образцов истинное значение неизвестно, поэтому X_{bar} -карта не может быть использована, а систематическая ошибка (систематическое отклонение, вносимое лаборантом) не может быть оценена. В этой ситуации основными процедурами КК являются использование S-карты для оценки изменчивости результатов, полученных разными лаборантами, и проведение двустороннего дисперсионного анализа (ANOVA) для оценки систематических различий между результатами, полученными разными лаборантами, после оценки каждых 5–10 образцов для КК.

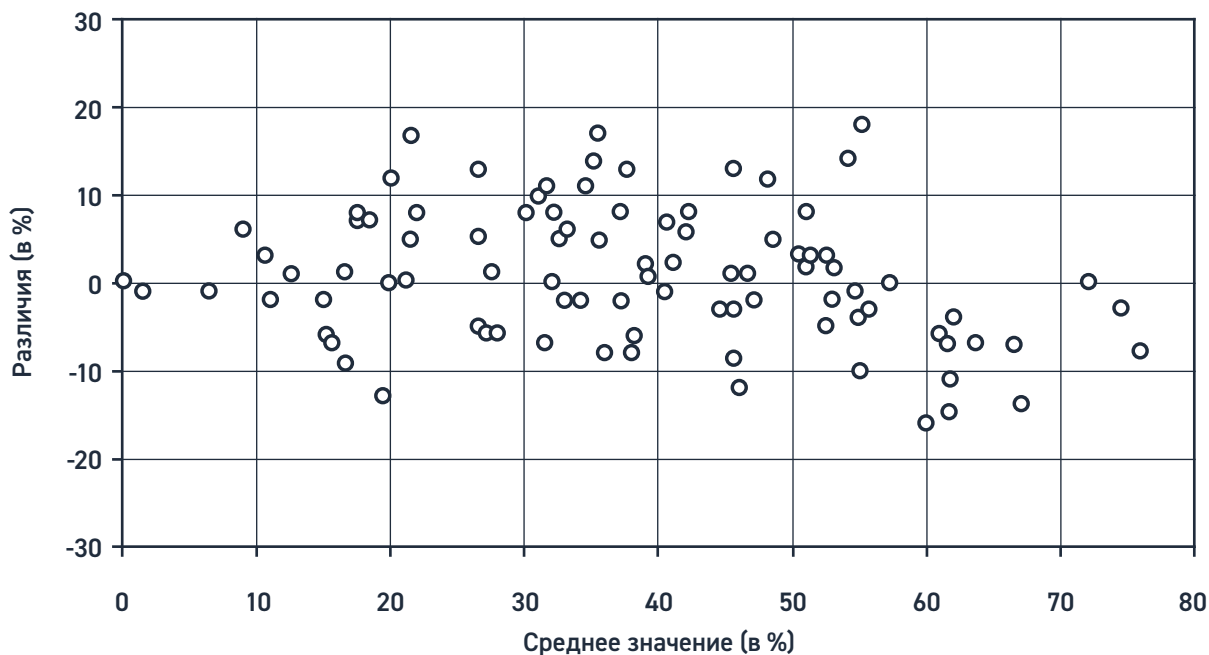
7.7.1 Сравнение результатов, полученных двумя или более лаборантами

Результаты, полученные двумя или более лаборантами, можно сравнить несколькими способами.

- Нанесение на карту различий между двумя оценками по отношению к их среднему значению (418). При сравнении оценок концентрации сперматозоидов в одном и том же образце, выполненных двумя лаборантами, будет получена картина, подобная той, что показана на рис. 7.3. На графике Блэнда-Альтмана среднее значение двух оценок откладывается по оси x, а различия – по оси y. В идеале все оценки должны располагаться около 0 по оси y. Общие систематические ошибки проявляются в отклонении от уровня нулевой разницы и в различиях. На рис. 7.3 среднее различие в 0,6% указывает на то, что систематическое отклонение незначительно; при этом изменчивость (СО 7,6%) превышает теоретическую ошибку выборки (менее 5%). Имеются также данные о том, что метод CASA дал более высокие значения по сравнению с лаборантами, выше 60% (102).

Рис. 7.3 График Блэнда-Альтмана для оценок процентной доли прогрессивно подвижных сперматозоидов, выполненных ручным методом и методом CASA

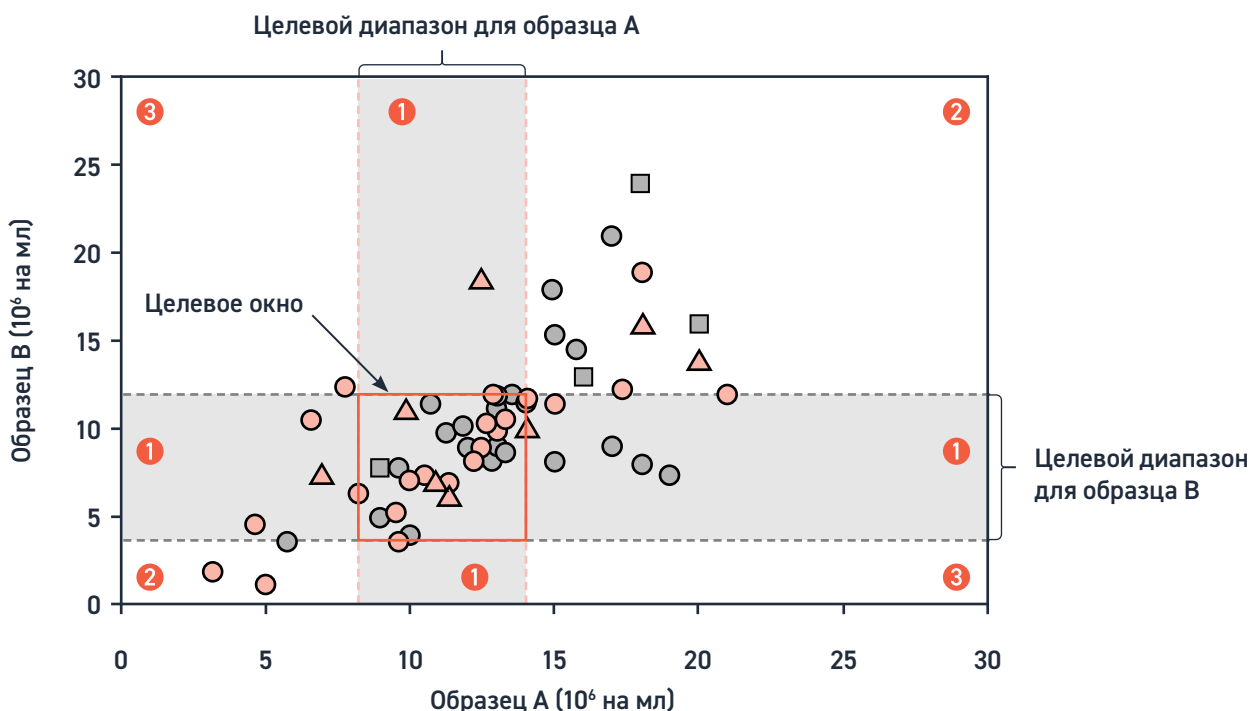
На графике показаны различия между результатами, полученными двумя методами (ручной и CASA) (ось y), по отношению к среднему значению $((\text{ручной} + \text{CASA})/2)$ (ось x).



- Расчет среднего значения и СО различий (парные сравнения). Поскольку оба сотрудника исследуют один и тот же образец, разность между средними значениями в идеале должна быть равна нулю. Любое значительное отличие от нуля, оцениваемое парным t-тестом, свидетельствует о систематическом отклонении (систематическом различии) между их оценками.
- Построение графиков результатов оценки двух образцов в сравнении друг с другом (графики Юдена). Сравнение оценок концентрации, выполненных несколькими сотрудниками, каждый из которых исследовал два отдельных образца, должно дать картину, подобную той, что показана на рис. 7.4. Для каждого сотрудника (в случае ВКК) или для каждого центра (в случае ВнКК) значения, полученные в результате исследования двух образцов, наносятся друг на друга. Пунктирные горизонтальные и вертикальные линии обозначают 95%-ные доверительные границы результатов, полученных опытными лаборантами (ВКК) или референс-лабораториями (ВнКК). Область, определяемая пересечением этих линий, является целевым окном, в которое должны попадать значения. Этот график отображает как случайные ошибки, когда значение для одного образца находится в правильном диапазоне, а значение для другого образца – за его пределами (область, обозначенная 1; одно значение правильное, а другое неправильное), так и систематические ошибки, когда оценки обоих образцов находятся слишком высоко (правый верхний квадрант, область, обозначенная 2; оба значения считаны как слишком высокие) или слишком низко (левый нижний квадрант, область, обозначенная 2; оба значения считаны как слишком низкие). Случайные ошибки, скорее всего, приводят к тому, что значение для одного образца находится слишком низко, а для другого – слишком высоко (область, обозначенная 3).

Рис. 7.4 График Юдена для оценок концентрации сперматозоидов

Наложенные друг на друга результаты исследований двух образцов (А и В), выполненных несколькими лаборантами. Результаты, полученные разными лаборантами (или лабораториями в случае ВНКК), могут быть обозначены разными символами и цветами. Результаты в квадрантах, обозначенных ②, скорее всего, обусловлены систематическими ошибками, в то время как результаты в квадрантах, обозначенных ① и ③, вероятно, связаны со случайными ошибками.



- Двусторонний дисперсионный анализ ANOVA. Эта методика описана во многих учебниках по статистике (например 419, 420) и доступна в пакетах программ обработки статистических данных, использующих статистические тесты на значимость различий результатов, полученных разными лаборантами. Как и в случае вышеописанного парного сравнения, различия между оценками всех лаборантов в идеале должны быть равны нулю. Таким образом, для каждого образца, оцениваемого каждым сотрудником, рассчитываются отклонения от среднего значения, а для каждого сотрудника – среднее значение и СО этих отклонений. Систематическое отклонение указывается для тех сотрудников, у которых абсолютное значение отклонения составляет более трех стандартных ошибок среднего значения.

Формальный статистический тест на различия между результатами сотрудников основан на F -тесте из двусторонней таблицы ANOVA, который содержится в большинстве статистических программ. Средние отклонения, превышающие примерно 2,5 стандартной ошибки, вряд ли являются результатом только случайного отклонения (менее 1,2%) и скорее всего реальны, или действительны. Независимо от того, являются ли различия между результатами сотрудников значительными или нет, необходимо проанализировать средние значения результатов или средние значения различий, с тем чтобы определить, какие из них являются более значительными, чем ожидалось. Не во всех компьютерных программах предусмотрено вычисление стандартной ошибки различий между результатами сотрудников, которую, возможно, потребуется рассчитывать отдельно. При наличии существенных различий между результатами необходимо проанализировать все процедуры для определения путей повышения согласованности.

Приведенный в следующем разделе пример с решением иллюстрирует, как рассчитать стандартную ошибку различий между результатами оценки концентрации сперматозоидов, выполненной разными сотрудниками, и оценить, являются ли эти различия более значительными, чем можно было бы ожидать только в результате случайного отклонения. При выполнении расчетов непосредственно на основе наблюдений необходимо сохранять достаточное количество знаков после запятой, чтобы избежать ошибок округления.

7.7.1.1 Оценка систематических различий между результатами лаборантов: пример с решением

Таблица 7.6 Концентрация сперматозоидов ($\times 10^6$ /мл) в пяти образцах для КК, оцененная тремя сотрудниками

Образец	1	2	3	4	5
A	108	45	100	50	92
B	103	47	102	50	96
C	104	46	89	41	88
Среднее значение	105,0	46,0	97,0	47,0	92,0

Таблица 7.7 Отличия значений образцов от среднего значения, рассчитанные путем вычитания среднего значения из значений, полученных для каждого образца эякулята

Образец	1	2	3	4	5
A	3,0	-1,0	3,0	3,0	0,0
B	-2,0	1,0	5,0	3,0	4,0
C	-1,0	0,0	-8,0	-6,0	-4,0

Таблица 7.8 Среднее значение, СО и среднее значение/стандартная ошибка этих различий, рассчитанные для каждого сотрудника (n = число образцов)

	Среднее значение	СО	Среднее значение/ стандартная ошибка	Стандартная ошибка
	$m_j = \sum_i d_{ij}/n$	$s_j = \sqrt{(\sum_i d_{ij}^2)/(n-1)}$	$(m_j/se(m_j))$	$se(m_j)$
A	1,600	1,949	1,836	0,871
B	2,200	2,775	1,773	1,241
C	-3,800	3,347	-2,539	1,497

Для сотрудника С среднее отличие от среднего значения для образца составляет $-3,8 \times 10^6$ /мл. Чтобы оценить, совместима ли степень недооценки со случайным отклонением, необходимо провести ряд расчетов (Таблица 7.9).

Таблица 7.9 Пошаговая инструкция по расчету меры отклонения

Пошаговая инструкция по расчету меры отклонения	Расчеты	Результат	Единица измерения
Сначала определите сумму CO^2 (CO из таблицы 7.8)	$1,949^2 + 2,775^2 + 3,347^2$	22,702	
Разделите сумму на 2 [3 сотрудника минус 1]	$22,702 / (3-1)$	11,351	
Извлеките корень для получения среднеквадратичной ошибки	$\sqrt{11,351}$	3,369	$\times 10^6$ /мл
Рассчитайте стандартную ошибку отдельных различий и среднеквадратичную ошибку [3 сотрудника, 5 образцов]	$3,369 \times \sqrt{((1-1/3)/5)}$	1,230	$\times 10^6$ /мл
Сравните 3*стандартную ошибку с абсолютным значением среднего отличия сотрудника С ($3,8 \times 10^6$ /мл)	$3,8 > 3 \times 1,230$ $3,8 > 3,691$		Ошибка!

Формальный статистический тест на различия между результатами лаборантов основан на F -тесте. Таблица ANOVA с использованием вышеуказанных концентраций сперматозоидов приведена в таблице 7.10. Различия между образцами для КК очень большие ($P < 0,001$), поскольку они взяты из разных образцов свежего эякулята. F -тест на различия между результатами сотрудников ($F = 4,81$ при 2 и 8 степенях свободы, $P = 0,042$) является значимым на уровне 0,05 и позволяет предполагать, что эти различия являются более значительными, чем можно было бы ожидать только в результате случайного отклонения.

Таблица 7.10 F -тест двустороннего анализа ANOVA для лаборантов и образцов для КК

Источник	Сумма квадратов	Степени свободы	Квадрат среднего значения	F -соотношение	P -значение
Образцы для КК	9807,6	4	2451,90	216,03	$< 0,001$
Сотрудники	109,2	2	54,60	4,81	0,042
Ошибка	90,8	8	11,35		
Всего	10 007,6	14			

Сводная информация о различных процедурах, применяемых в основном для оценок в рамках ВКК, приведена в таблице 7.11.

Таблица 7.11 Основные особенности процедур ВКК

Процедура	Обнаруживаемые ошибки	Материал для КК	Число лаборантов
X_{bar} -карта	систематическое отклонение, чрезмерная изменчивость, точность	хранящийся	один, несколько
S-карта	систематическое отклонение/прецизионность	хранящийся/свежий	несколько
Двусторонний анализ ANOVA	систематическое отклонение/прецизионность	хранящийся/свежий	несколько
График Блэнда-Альтмана	систематическое отклонение/прецизионность	хранящийся/свежий	два
Парные тесты	систематическое отклонение/прецизионность	хранящийся/свежий	два
Графики Юдена	систематическое отклонение/прецизионность	хранящийся/свежий	несколько

7.7.2 Мониторинг ежемесячных средних значений

Основные процедуры ВКК основаны на оценке различий между результатами, полученными одним или несколькими сотрудниками, а дополнительную информацию можно получить путем отслеживания тенденций в результатах исследования эякулята.

Средние значения каждой переменной для всех пациентов, обследованных за определенный период (например за месяц), могут быть нанесены на X_{bar} -карту с предупредительными границами и пределами для вмешательства, расположенными на 2 и 3 стандартные ошибки по обе стороны от среднего значения. Стандартная ошибка может быть оценена по СО исходных данных, разделенному на квадратный корень из числа исследований эякулята, проведенных за каждый период, или непосредственно на основе наблюдаемого распределения среднего значения. Пределы допустимых значений следует определять на основе результатов исследований, проведенных в течение не менее 6 месяцев, и регулярно пересматривать. Для получения каждого среднего значения необходимо иметь не менее 20 результатов; в небольшой лаборатории может потребоваться объединение результатов, полученных более чем за один месяц. Усовершенствование метода включает мониторинг ежемесячных средних значений результатов у пациентов с нормальными показателями и использование графиков кумулятивных сумм (CUSUM) для быстрого обнаружения любых систематических отклонений от среднего значения (421).

Отклонения от ожидаемых значений могут быть связаны с различными характеристиками пациентов (обусловленные временем изменения в состоянии обследуемых мужчин, изменение числа повторных тестов у одних и тех же мужчин, изменения в схеме направления мужчин с разными видами бесплодия) или техническими факторами (изменения в кадровом составе лаборатории, изменения в лабораторном материально-техническом обеспечении, сезонные колебания температуры, замена оборудования, различия между лаборантами).

7.8 Внешний контроль качества и процедуры обеспечения качества

ВнКК в качестве неотъемлемой части полномасштабного процесса КК предназначен для мониторинга результатов исследований, в то время как ВНОК осуществляется для мониторинга всех лабораторных процедур, связанных со сбором и представлением данных, с тем чтобы удостовериться в том, что лабораторные процессы находятся под контролем. ВнКК позволяет лаборатории сравнивать свои результаты с результатами других лабораторий, выполняющих те же исследования. Он позволяет оценивать и сравнивать различные методы в масштабах, не доступных для одной лаборатории.

ВнКК и ВКК необходимо проводить вместе, поскольку они являются важными взаимодополняющими процессами. ВнКК может выявлять проблемы с точностью, которую невозможно обеспечить при ВКК в связи с недостаточно тщательной маскировкой и отбором контрольных образцов. Преимущество ВнКК заключается в том, что он позволяет лаборатории контролировать точность и стабильность своих методов (422). Вместе с тем, поскольку образцы для ВнКК явно происходят из внешних источников или иной матрицы, к ним может требоваться особый подход; этого следует избегать, с тем чтобы обрабатывать эти образцы по возможности так же, как и обычные образцы.

ВнКК охватывает программы сравнения между лабораториями и сличительные испытания, в рамках которых предположительно идентичные образцы направляются для исследования во все участвующие лаборатории (423). Лаборатории представляют свои результаты в центральное учреждение, где проводится проверка данных на наличие резко отклоняющихся значений и рассчитываются средние значения и СО для оценки эффективности деятельности участвующих лабораторий.

7.8.1 Оценка результатов ВнКК

Программы ВнКК предоставляют лабораториям информацию как об их собственных результатах, так и о результатах других участвующих лабораторий, использующих одинаковые или разные методы для оценки того или иного аналита. Необходимо установить, как были получены конкретные целевые значения, – в результате точных измерений, многократных подсчетов концентрации сперматозоидов с помощью гемоцитометра, компьютерного анализа подвижности сперматозоидов; или они были предоставлены группой надлежащим образом контролируемых референс-лабораторий; или они являются усеченными средними значениями всех участвующих центров. Результаты часто отображаются графически, например в виде гистограммы, что позволяет быстро получить визуальное представление о полученных данных. Если один и тот же образец для ВнКК используется несколько раз, указываются также систематическое отклонение и изменчивость результатов лаборатории применительно к данному образцу.

Когда для исследования предоставляются два образца, часто строится график Юдена, в котором значения для каждого образца откладываются по осям x и y (рис. 7.4 на стр. 231). Степень различий в оценке центров четко просматривается по разбросу и распределению нанесенных значений. Можно визуализировать дополнительные данные, например путем использования разных символов или цветов для обозначения разных методов (использование счетных камер, красителей или критериев оценки) или разных центров.



При распределении более двух образцов могут быть указаны различные аспекты систематического отклонения (отличие от установленного значения). К ним относятся:

- индекс систематического отклонения (BIS): систематическое отклонение, разделенное на выбранный коэффициент изменчивости $\times 100$; может быть положительным или отрицательным;
- индекс дисперсии (VIS): аналогичный BIS, но всегда положительный;
- средние текущие оценки BIS или VIS (MRBIS, MRVIS), которые помогают определить тенденции.

Низкая MRBIS и низкая MRVIS указывают на то, что результаты близки к установленным значениям; низкая MRBIS, но высокая MRVIS могут указывать на случайную ошибку, а высокая MRBIS и высокая MRVIS – на систематические ошибки. Для инспекционной проверки и сертификации лабораторий результаты целесообразно представлять как удовлетворительные/неудовлетворительные или оцененные по шкале.

Простым способом мониторинга эффективности деятельности является построение графика результатов лаборатории (по оси y) по сравнению с целевыми значениями (по оси x) для каждого параметра. Это наглядно показывает, насколько близко к линии идентичности находятся значения лаборатории. В качестве альтернативного варианта отличия от целевых значений могут быть показаны на графике Блэнда-Альтмана (рис. 7.3 на стр. 230).

7.8.2 Меры в связи с результатами, выходящими за установленные пределы

Важная информация, полученная в ходе осуществления программ ВНКК, касается систематического отклонения или точности результатов лабораторий и лабораторных методов. Желаемый результат заключается в том, чтобы лаборатории поддерживали или улучшали точность своих методов (422). Лабораториям, результаты которых постоянно/стабильно находятся на уровне выше или ниже установленного значения или среднего значения по схеме ВНКК, необходимо пересмотреть свои методы. Широкая изменчивость результатов ВНКК обычно связана с широкой изменчивостью результатов ВКК и указывает на непоследовательность в осуществлении процедур тестирования разных образцов. Следует тщательно пересмотреть технические процедуры, с тем чтобы обеспечить их соответствие рекомендациям данного руководства.

Соответствующие действия включают те, которые обсуждались применительно к ВКК (раздел 7.6.3 на стр. 228), а также переподготовку технического персонала и повторное тестирование образцов. В таблицах 7.14–7.17 на стр. 240 указываются также потенциальные источники изменчивости результатов исследования эякулята. Часто бывает полезно организовать обмен научными сотрудниками между лабораториями или обучение технических сотрудников в лабораториях с хорошими результатами ВНКК. Консультанты из лабораторий с хорошими результатами ВНКК часто могут изыскать возможности для изменения методов в целях улучшения воспроизводимости результатов.

7.9 Частота и приоритетность процедур контроля качества

Исследования образцов для КК должны выполняться в рутинном порядке. Частота проведения исследований может определяться национальными или местными рекомендациями или предписываться законами о лицензировании лабораторий или аккредитационными агентствами, при этом минимальное число исследований должно быть согласовано национальными регулирующими органами. Это зависит от количества образцов, исследуемых в лаборатории. По некоторым правилам исследования образцов для КК требуется проводить во все дни, когда оценивается концентрация сперматозоидов; в иных случаях на ВКК следует направлять от 1% до 5% образцов.

Образцы для КК следует использовать в следующих ситуациях:

- для контроля работы сотрудников;
- при использовании нового лабораторного оборудования, материалов, процедур или партий образцов для ВКК; и
- в качестве возможной составной части программы регулярного или периодического технического обслуживания.

Таблица 7.12 содержит общее руководство по составлению графика КК; на практике график зависит от рабочей нагрузки в лаборатории. В таблице 7.13 показана приоритетность разных протоколов КК; некоторые процедуры могут быть практически не осуществимыми для лабораторий с ограниченным финансированием.

Таблица 7.12 Временной график КК

На постоянной основе	контроль и корреляция результатов одного и того же образца
Еженедельно/ежемесячно	анализ повторных оценок, выполненных разными лаборантами
Ежемесячно	анализ средних значений результатов
Ежеквартально/раз в полгода	участие во ВнКК
Раз в полгода/ежегодно	калибровка пипеток, счетных камер и другого оборудования

Таблица 7.13 Обзор методов КК

Параметр	Материал	Целевое значение	Точность/ систематическое отклонение	Прецизионность	Приоритетность (1 > 2 > 3)
Концентрация	Свежий образец для ВКК	Нет		S-карта, двусторонний анализ ANOVA	1
	Хранящийся образец для ВКК	Да	X_{bar} -карта	S-карта	3
	ВнКК	Да	X_{bar} -карта	S-карта	2
Морфология	Свежий образец для ВКК	Нет		S-карта, двусторонний анализ ANOVA	1
	Хранящийся образец для ВКК	Да	X_{bar} -карта	S-карта	3
	ВнКК	Да	X_{bar} -карта	S-карта	2
Подвижность	Свежий образец для ВКК	Нет		S-карта, двусторонний анализ ANOVA	1
	Хранящийся образец для ВКК	Да	X_{bar} -карта	S-карта	3
	ВнКК	Да	X_{bar} -карта	S-карта	2
Жизнеспособность	Свежий образец для ВКК	Нет		S-карта, двусторонний анализ ANOVA	1
	Хранящийся образец для ВКК	Да	X_{bar} -карта	S-карта	3
	ВнКК	Да	X_{bar} -карта	S-карта	2

7.10 Обучение

Аналогичный подход к КК может быть использован при обучении сотрудников, внедрении новых исследований или оценке модификаций существующих методов. Обучение сотрудников должно включать повышение осведомленности о подходах, описанных ниже.

7.10.1 Практические рекомендации при возникновении трудностей в процессе оценки концентрации сперматозоидов

- Изучите процедуры перемешивания и разведения, строение сетки камеры и необходимые расчеты. Целесообразно иметь контрольный перечень этапов процедур.



- Оценивайте образцы не позднее 10–15 минут после заполнения камеры; по истечении этого времени испарение оказывает заметное воздействие на расположение сперматозоидов внутри камеры, если только не используется влажная камера.
- Два сотрудника должны работать вместе, используя сдвоенный микроскоп или микроскоп, оснащенный видеокамерой и монитором, для сравнения процедур разведения, заполнения и подсчета. Они должны подсчитывать сперматозоиды в одной и той же загруженной камере, сравнивая значения для рядов или квадратов, с тем чтобы найти источник расхождений.
- Используйте сдвоенный микроскоп в процессе подсчета и учебных занятий или исследуйте сперматозоиды, используя окулярную сетку, которая позволит определить, находятся ли отдельные сперматозоиды на линии и следует ли их учитывать при подсчете.
- Изучите **таблицу 7.14**.

7.10.2 Практические рекомендации при возникновении трудностей в процессе морфологической оценки сперматозоидов

- Выполняйте рекомендации, содержащиеся в настоящем руководстве. Изучите микрофотографии и соответствующие комментарии к каждому сперматозоиду.
- При исследовании всегда обращайтесь внимание на все четыре области каждого сперматозоида, используя структурированную оценку (**рис. 2.10 на стр. 58**).
- Обращайте особое внимание на сперматозоиды с пограничной морфологией. Их следует классифицировать как аномальные.
- Проводите оценку и учебные занятия с использованием сдвоенного микроскопа или микроскопа, оснащенного видеокамерой и монитором.
- Изучите **таблицу 7.15**.

7.10.3 Практические рекомендации при возникновении трудностей в процессе оценки подвижности сперматозоидов

- Готовьте препараты непосредственно перед оценкой. Для уменьшения систематического отклонения при оценке общей подвижности считывайте данные только после полного прекращения растекания эякулята.
- Выбирайте поля случайным образом и не останавливайте свой выбор на полях с большим или малым числом подвижных сперматозоидов. Один из способов сделать это – не смотреть в окуляры до тех пор, пока поле не будет выбрано.
- Не откладывайте подсчет до тех пор, пока подвижные сперматозоиды не попадут в поле.

- Проводите исследование быстро; исследуйте за один раз только небольшую часть сетки в зависимости от концентрации сперматозоидов.
- Исследуйте какой-либо участок сетки как можно быстрее, с тем чтобы избежать подсчета сперматозоидов, заплывших в эту область во время исследования.
- Подсчитывайте прогрессивно подвижные, непрогрессивно подвижные и неподвижные сперматозоиды в два этапа. При возникновении проблем с методикой измените порядок исследования.
- Изучите **таблицу 7.16**.

7.10.4 Практические рекомендации при возникновении трудностей в процессе оценки жизнеспособности сперматозоидов

- Уделяйте особое внимание умению различать сперматозоиды с красными или розовыми головками (мертвые) от сперматозоидов с белыми головками (живые) (сперматозоиды с бледно-розовым окрашиванием головки оцениваются как мертвые). Если окрашивание ограничено только частью шейной области, а остальная часть головки не окрашена, это считается признаком «протекающей мембраны шейки», а не гибели клетки и полного разрушения мембраны.
- Проводите исследование с помощью рекомендуемого метода с использованием эозин-нигрозина (**раздел 2.4.7 на стр. 30**).
- Изучите **таблицу 7.17**.

Таблица 7.14 Источники отклонений (ошибок) при оценке концентрации сперматозоидов

Процедура	Предотвращение	Контроль
До исследования (при сборе и обработке образца)		
Недостаточное перемешивание образцов эякулята перед разведением	Обучение, СОП	Повторные разведения
Ошибки при разведении (например считать, что разведение 1 : 20 равно 1+20, когда в действительности это 1+19)	Обучение, СОП	ВКК
Нарушение калибровки пипетирующего устройства (например, пипетка отрегулирована на 100 мкл, но в действительности набирает 95 мкл или 110 мкл)	Техническое обслуживание оборудования, СОП	Повторные разведения, ВКК, ВнКК
Использование неподходящей пипетки (например, пипетки с вытеснением воздуха вместо пипетки с прямым вытеснением)	Обучение, СОП	Повторные разведения, ВКК, ВнКК
Использование малого объема для разведения, что сопряжено с высоким риском нерепрезентативной выборки	Обучение, СОП	Повторные разведения, ВКК, ВнКК
Не вытерты остатки эякулята с внешней стороны наконечника пипетки перед дозированием в жидкость для разведения	Обучение, СОП	ВКК

Процедура	Предотвращение	Контроль
В процессе исследования (в результате оценки исследуемого образца)		
Камера не очищена и не высушена	Обучение, СОП	Повторные разведения
Неправильная сборка или заполнение камеры (например, частицы грязи на опорах могут изменить высоту камеры)	Обучение, СОП	Повторные разведения
Слишком большой промежуток времени между перемешиванием эякулята и взятием аликвоты для разведения (сперматозоиды в эякуляте начинают сразу же оседать)	Обучение, СОП	Повторные разведения и оценки
Слишком большой промежуток времени между вихревым перемешиванием разведенного препарата и заполнением камеры (разведенные сперматозоиды начинают сразу же оседать)	Обучение, СОП	Повторные разведения и оценки
Микроскоп не очищен или не отрегулирован должным образом; неправильное увеличение	Обучение, СОП, техническое обслуживание оборудования	ВКК и ВнКК
Недостаточное время ожидания после заполнения камеры перед исследованием (недостаточное время для осаждения сперматозоидов)	Обучение, СОП	Повторные оценки, ВКК и ВнКК
Камера гемоцитометра не находится в горизонтальном положении во время осаждения сперматозоидов или камера не находится во влажной среде во время осаждения сперматозоидов	Обучение, СОП	Повторные оценки, ВКК и ВнКК
Неправильная идентификация сперматозоидов (например, принятие дедбриса за сперматозоиды или пропуск труднораспознаваемых сперматозоидов при подсчете)	Обучение, СОП	ВКК и ВнКК
Оценка слишком малого или слишком большого числа рядов сетки (т.е. неправильные расчеты); остановка в середине ряда	Обучение, СОП	ВКК и ВнКК
Подсчет слишком малого числа сперматозоидов, что приводит к значительной ошибке выборки	Обучение, СОП	ВКК и ВнКК
Непоследовательная оценка сперматозоидов на линиях счетного поля (например, завышение концентрации в результате подсчета сперматозоидов на верхней, нижней, левой и правой границах)	Обучение, СОП	ВКК и ВнКК
Неисправная работа многоклавишного счетчика	Техническое обслуживание оборудования	ВКК и ВнКК
Математическая ошибка при расчетах или корректировке разведения	Обучение, СОП	ВКК и ВнКК
Использование капиллярной камеры (неравномерное распределение сперматозоидов при заполнении)	Обучение, СОП	ВКК и ВнКК

Таблица 7.15 Источники отклонений (ошибок) при морфологической оценке сперматозоидов

Процедура	Предотвращение	Контроль
Микроскоп не очищен или не отрегулирован должным образом; неправильное увеличение	Обучение, СОП, техническое обслуживание оборудования	ВКК, ВнКК
Недостаточный уровень обучения для проведения исследования	Обучение	ВКК, ВнКК
Субъективные методы без четких рекомендаций	Обучение, СОП	ВКК, ВнКК
Скрытое воздействие коллег на системы классификации (может вызывать изменения в ходе исследования)	Обучение	ВКК (контрольные карты)
Эякулят недостаточно перемешан при приготовлении мазка	Обучение, СОП	ВКК
Неадекватное приготовление мазка (т.е. слишком толстый или слишком тонкий)	Обучение, СОП	ВКК
Неадекватная методика окрашивания (т.е. светлое, темное или слишком сильное фоновое окрашивание)	Обучение, СОП	ВКК
Оценка сперматозоидов на краю предметного стекла	Обучение, СОП	ВКК
Попытка оценить сперматозоиды, которые не лежат на плоскости или перекрывают другие сперматозоиды	Обучение, СОП	ВКК
Отбор сперматозоидов для оценки вместо оценки всех сперматозоидов в области	Обучение, СОП	ВКК
Обесцвечивание окрашенного препарата со временем (для хранящихся образцов для ВКК)	Обучение, СОП	ВКК (контрольная карта)
После исследования (в связи с информированием о результатах исследования в неавтоматическом или электронном формате)		
Ошибки при расчетах процентных долей, которые в сумме не составляют 100	Обучение, СОП	ВКК, ВнКК
Неисправная работа многоклавишного счетчика	Техническое обслуживание	ВКК, ВнКК

Таблица 7.16 Источники отклонений (ошибок) при оценке подвижности сперматозоидов

Процедура	Предотвращение	Контроль
Ненадлежащее перемешивание образцов эякулята перед отбором аликвот	Обучение, СОП	Повторный отбор и оценка образцов, ВКК
Слишком большой промежуток времени между подготовкой предметного стекла и исследованием (сперматозоиды быстро теряют подвижность)	Обучение, СОП	Повторный отбор и оценка образцов, ВКК
Неправильная температура обогревателя предметного столика (например, слишком высокая температура приводит к гибели сперматозоидов)	Обучение, СОП, техническое обслуживание оборудования	ВКК
Микроскоп не очищен или не отрегулирован должным образом; неправильное увеличение	Обучение, СОП, техническое обслуживание оборудования	ВКК, ВнКК
Отсутствие окулярной сетки для ориентирования	Оборудование	ВКК (контрольная карта)
Проведение исследования в области у краев покровного стекла (сперматозоиды погибают или становятся вялыми в области около 5 мм от краев покровного стекла)	Обучение, СОП	Повторная оценка, ВКК
Слишком медленное проведение оценки (за время оценки в область для оценки заплывают другие сперматозоиды)	Обучение, СОП	ВКК
Неисправная работа многоклавишного счетчика	Техническое обслуживание оборудования	ВКК, ВнКК
Ошибки при расчетах процентных долей, которые в сумме не составляют 100	Обучение, СОП	ВКК, ВнКК
Субъективное систематическое отклонение (т.е. постоянная слишком высокая или слишком низкая процентная доля подвижных сперматозоидов)	Обучение, СОП	ВКК, ВнКК
Подготовительные процедуры, снижающие подвижность (например, изменение температуры, энергичное перемешивание, загрязнение токсинами)	СОП	ВКК
Неслучайный выбор полей для исследования; задержка в проведении исследования (например, до тех пор, пока подвижные сперматозоиды не заплывут в поле или квадрат для исследования)	Обучение, СОП	ВКК, ВнКК

Таблица 7.17 Источники отклонений (ошибок) при оценке жизнеспособности сперматозоидов

Процедура	Предотвращение	Контроль
Микроскоп не очищен или не отрегулирован должным образом; неправильное увеличение	Обучение, СОП, техническое обслуживание оборудования	ВКК, ВнКК
Неправильное окрашивание: некоторые методы создают гипосмотические условия, в которых сперматозоиды погибают	Обучение, СОП	Сравнение с подвижностью
Слишком большой промежуток времени до окрашивания	Обучение, СОП	Сравнение с подвижностью
При регидратации высушенного мазка без непосредственного заключения в гистологическую среду краситель проникает во все сперматозоиды	Обучение, СОП	Сравнение с подвижностью
Переоценка числа живых сперматозоидов (например, считать живыми сперматозоиды с головкой в целом светло-розового цвета)	Обучение, СОП	ВКК, ВнКК
Причисление сперматозоидов с розовым окрашиванием, ограниченным шейной областью, к категории мертвых	Обучение, СОП	ВКК, ВнКК



Глава 8. Приложения

8.1 Интерпретация результатов исследования эякулята ..	245
8.2 Оборудование и безопасность.....	249
8.3 Микроскопия для базового исследования эякулята	257
8.4 Исходные растворы и среды.....	263
8.5 Образец формы для записи результатов исследования эякулята	270
8.6 Материал для КК.....	272
8.7 Национальные программы внешнего контроля качества исследований эякулята.....	285

8.1 Интерпретация результатов исследования эякулята

Настоящее пособие не является руководством для принятия клинических решений в отношении выбора методов лечения бесплодия по мужскому фактору. Тем не менее, каждая лаборатория несет ответственность за предоставление информации, которая может облегчить интерпретацию результатов. Наиболее требуемая информация касается границы между фертильностью и бесплодием. В первых четырех изданиях данного руководства приводились границы, традиционно устанавливаемые в результате консенсуса. В пятом издании было представлено распределение значений, полученных в результате обследования мужчин, у партнерш которых в течение 12 месяцев произошло естественное зачатие; нижний пятый процентиль этого распределения затем часто интерпретировался как истинная граница между фертильными и бесплодными мужчинами. В этой связи необходимо расширить концепцию интерпретации результатов исследования эякулята.

8.1.1 Распределение результатов обследования мужчин, у партнерш которых время до наступления беременности (ВНБ) не превысило одного года

Данные, представленные в пятом издании (424), были дополнительно оценены и дополнены данными обследования примерно 3500 мужчин в 12 странах (5) (см. **таблицы 8.1, 8.2 и 8.3 на стр. 246**). Тот факт, что данные были собраны из разных географических областей земного шара, представляет собой огромное достижение. Большой интерес представляет и то, что в этом распределении данных не наблюдается значительных отличий от подборки данных 2010 г. Новые сводные данные являются еще более строгими и включают только самые достоверные данные. Таким образом, данные в таблице 8.2 представляют информацию о распределении результатов обследования мужчин, у партнерш

которых естественное зачатие произошло в течение одного года попыток (ВНБ не более 12 месяцев). Нижний пятый процентиль представляет собой уровень, ниже которого находятся результаты обследования только 5% мужчин из референтной группы. Это может помочь в интерпретации результатов отдельных пациентов.

Во избежание чрезмерной интерпретации необходимо соблюдать меры предосторожности. Определение референтной группы допускает определенную степень несогласованности. Эти мужчины определены на основе использования предельного срока, после которого пару следует считать бесплодной: не менее одного года незащищенных половых контактов без достижения естественного зачатия (ВНБ более 12 месяцев). Это означает, что референтная группа определяется как мужчины, не принадлежащие к парам с ВНБ более 12 месяцев. Вместе с тем у некоторых пар, несмотря на проблемы с эякулятом, в течение года происходит естественное зачатие. Кроме того, другие мужчины с совершенно нормальными характеристиками эякулята относятся к категории бесплодных из-за преимущественно женских факторов. Это указывает на проблему, связанную с применением дихотомической классификации по отношению к фертильности, которая должна рассматриваться как континуум (425). Кроме того, хорошо известно о наличии значительных совпадений результатов исследования эякулята у фертильных и бесплодных мужчин (6, 8, 426, 427).

Данные, использованные для статьи Кэмпбелла и др. (5), находятся в свободном доступе по адресу <https://doi.org/10.15132/10000163> и, следовательно, могут быть изучены исследователями, добавлены к имеющимся данным и повторно проанализированы в случае необходимости.

Таблица 8.1 Определение референтной группы в документе Кэмпбелла и др. (5)

Критерий для включения	Критерий для исключения
<ul style="list-style-type: none"> • Мужчины, у партнерш которых произошло естественное зачатие в течение подтвержденного ВНБ, составившего не более 12 месяцев • Половое воздержание от 2 до 7 дней • Лабораторные методики: <ul style="list-style-type: none"> • Соответствие требованиям руководства ВОЗ 2010 г. и соблюдение рекомендаций Бьёрндала, Баррата, Мортимера и Жуанне (428) • Внутренний контроль качества • Внешняя оценка качества 	<ul style="list-style-type: none"> • Мужчины, которые посещали клиники по лечению бесплодия или проходили оценку фертильности

Таблица 8.2 Происхождение данных для распределения результатов (5)

В таблице представлено общее число участников каждого исследования в соответствии с критериями включения и исключения для сбора данных.

Происхождение исследования		
Страна	Континент	Число участников
Включены в руководство ВОЗ 2010 г.		
Австралия	Океания	206
Норвегия	Европа	82
Соединенные Штаты Америки	Америка	487
Дания, Финляндия, Франция, Соединенное Королевство	Европа	826
Дания	Европа	199
Новые, после выпуска руководства ВОЗ 2010 г.		
Китай	Азия	1200
Египет	Африка	240
Греция	Европа	76
Исламская Республика Иран	Азия	168
Италия	Европа	105

Таблица 8.3 Распределение результатов исследования эякулята мужчин, у партнерш которых в результате незащищенных половых актов, практиковавшихся в течение года, произошло естественное зачатие. Из документа Кэмпбелла и др. (5); пятый процентиль указан с изменчивостью (95%-ный доверительный интервал)

	N	Процентили									
		2,5-й	5-й	(95%- ный ДИ)	10-й	25-й	50-й	75-й	90-й	95-й	97,5-й
Объем эякулята (мл)	3586	1,0	1,4	(1,3–1,5)	1,8	2,3	3,0	4,2	5,5	6,2	6,9
Концентрация сперматозоидов (10 ⁶ на мл)	3587	11	16	(15–18)	22	36	66	110	166	208	254
Общее число сперматозоидов (10 ⁶ на образец)	3584	29	39	(35–40)	58	108	210	363	561	701	865
Подвижные сперматозоиды (PR + NP, %)	3488	35	42	(40–43)	47	55	64	73	83	90	92
Прогрессивно подвижные сперматозоиды (PR, %)	3389	24	30	(29–31)	36	45	55	63	71	77	81

	N	Процентили									
		2,5-й	5-й	(95%- ный ДИ)	10-й	25-й	50-й	75-й	90-й	95-й	97,5-й
Непрогрессивно подвижные сперматозоиды (NP, %)	3387	1	1	(1-1)	2	4	8	15	26	32	38
Неподвижные сперматозоиды (IM, %)	2800	15	20	(19-20)	23	30	37	45	53	58	65
Жизнеспособные сперматозоиды (%)	1337	45	54	(50-56)	60	69	78	88	95	97	98
Нормальные формы (%)	3335	3	4	(3,9-4,0)	5	8	14	23	32	39	45

8.1.2 Другие методы оценки результатов исследования эякулята

8.1.2.1 Многопараметрическая интерпретация

Для общего прогнозирования живорождения как *in vivo*, так и *in vitro* была предложена многопараметрическая интерпретация результатов исследования эякулята (7-9, 427). Комбинированные референсные пределы для такой интерпретации еще предстоит разработать.

8.1.2.2 Уровни принятия решений

Бесплодие по мужскому фактору обусловлено широким спектром известных и неизвестных причин, что свидетельствует о необходимости более тщательного диагностического обследования мужчин в бесплодных парах. Исследование эякулята может быть полезным для диагностики и лечения нарушений, например при эндокринном обследовании и последующем лечении эндокринных заболеваний и отборе пациентов для скрининга на генетические нарушения, такие как синдром Клайнфельтера, микроделеции, транслокации и инверсии Y-хромосомы, мутации при муковисцидозе и цилиарная дискинезия. Необходимо разработать клинически значимые уровни принятия решений для таких исследований.

Уровни принятия решений основаны на клинических и статистических соображениях, указывающих на необходимость того или иного диагностического или терапевтического вмешательства (429, 430).

8.1.3 Предостережение в отношении обследования мужчин на фертильность на основе результатов исследования эякулята

Нижний пятый процентиль данных, полученных в результате обследования мужчин из референтной группы (таблица 8.3), не является границей между фертильными и бесплодными мужчинами.

8.2 Оборудование и безопасность

8.2.1 Основные расходные материалы, необходимые в андрологической лаборатории

Ниже приведен список расходных материалов и оборудования, необходимых андрологической лаборатории для проведения базовых исследований, описанных в данном руководстве.

Если вам требуется помощь в поиске источника любых из нижеследующих расходных материалов, обратитесь к опубликованной научной литературе, ссылки на которую приведены в данном руководстве или в других источниках.

8.2.1.1 Общее оборудование и расходные материалы

- Лабораторные весы (для взвешивания сосудов с эякулятом)
- Лабораторные столы с непромокаемой рабочей поверхностью
- Контейнеры:
 - для утилизации острых предметов
 - для опасных отходов
- Экземпляр Руководства по лабораторной биобезопасности (48)
- Морозильная камера для низкотемпературного замораживания (-20°C)
- Дезинфицирующее средство или гипохлорит натрия, 0,1% (v/v) и 1% (v/v) в очищенной воде
- Дезинфицирующее мыло или антисептическое средство для очищения кожи
- Одноразовые перчатки
- Раствор или средство для промывания глаз
- Аптечка первой помощи
- Вытяжной шкаф для хранения токсичных реактивов, химикатов и красителей и работы с ними
- Холодильник
- Душ.



8.2.1.2 Расходные материалы и оборудование для базового исследования эякулята

- Центрифуги:
 - стендовая центрифуга, способная достигать 300–500g (для обычной работы с эякулятом и мочой), 1000g (для маркеров эякулята) и 2000g (для вязких образцов). В центрифуге должна быть предусмотрена возможность использования герметичных емкостей для минимизации риска образования аэрозолей.
 - высокоскоростные центрифуги, достигающие 3000g (для приготовления образцов с предполагаемой азооспермией) или 16 000g (для получения семенной плазмы без сперматозоидов). В центрифугах должна быть предусмотрена возможность использования герметичных емкостей для минимизации риска образования аэрозолей.
- Пробирки для разведения
- Фильтровальная бумага, 90 г/м² (для фильтрования красителей)
- Гемоцитометры: усовершенствованный гемоцитометр Нейбауэра или альтернативный гемоцитометр, глубиной 100 мкм с толстым покровным стеклом (толщина № 4, 0,44 мм)
- Инкубатор (37°C)
- Лабораторная пленка, самогерметизирующаяся, гибкая
- Лабораторный многоклавишный счетчик (шесть или девять клавиш)
- Предметные стекла для микроскопа:
 - с матовой или текстурированной поверхностью для записей и покровными стеклами (толщина № 1,5, 0,16–0,19 мм)
 - обычные предметные стекла для размазывания капли эякулята по поверхности другого стекла в целях получения мазков эякулята
- Ручки/карандаши:
 - для письма на матовых предметных стеклах подходит графитовый карандаш мягкости HB (по американской системе № 2)
 - несмываемый маркер
- Индикаторная бумага для определения pH (диапазон 6–10)
- Фазово-контрастный микроскоп (для оценки концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов) и следующие принадлежности (см. **приложение 8.3 на стр. 257**):
 - объективы ×10, ×20 (или ×25), ×40 (или ×63) с положительной фазой, объектив с масляной иммерсией ×100

- широкопольный окуляр $\times 10$ (или $\times 12,5$)
- окулярная сетка (для определения области, изучаемой при оценке подвижности сперматозоидов)
- объект-микрометр (для морфологической оценки сперматозоидов)
- подогреваемый предметный столик (по желанию, но настоятельно рекомендуется; для измерения скорости сперматозоидов)
- Пипетки и наконечники для пипеток:
 - пипетки Пастера с латексными дозаторами, пластиковые одноразовые пипетки для переноса материала или автоматические пипетки для перемешивания эякулята
 - пипетки с вытеснением воздуха
 - пипетки с прямым вытеснением для отмеривания 10–100 мкл
- Формы для записи результатов исследования эякулята и слизи (см. **приложение 8.5 на стр. 270**)
- Миксеры для образцов:
 - двухмерный шейкер или вращающееся колесо для перемешивания эякулята (по желанию)
 - вихревой смеситель для разведенных и фиксированных образцов эякулята
- Контейнеры для сбора эякулята:
 - одноразовые контейнеры с широким горлом и крышками
 - планшет с лунками, фарфоровый или из боросиликатного стекла (для эозин-нигрозинового теста)
- бумажное полотенце, безворсовое.

8.2.1.3 Дополнительное оборудование

- Аналитические весы для взвешивания химических веществ
- Оборудование для криоконсервации (по желанию)
- Презервативы, без спермицидов, нетоксичные (по желанию)
- Флуоресцентный микроскоп и объективы (по желанию; для высокочувствительных измерений концентрации сперматозоидов, тестов на акросомную реакцию)
- Инкубатор (37°C), с контролируемым процентным содержанием (v/v) CO₂ (по желанию)



- Люминометр (по желанию; для исследования на активные формы кислорода (АФК))
- Ручки/карандаши: восковой/жирный карандаш (ручка для обозначения границ) (по желанию; для ограничения области нанесения раствора антител на предметное стекло)
- pH (ISFET) электрод (по желанию; для вязких образцов эякулята)
- Оборудование для микроскопа
- Объектив с отрицательной фазой $\times 40$ (по желанию; для эозинового теста на жизнеспособность)
- England Finder (предметное стекло с сеткой; по желанию; для оценки КК)
- Герметизирующая лента для 96-луночных планшетов (по желанию; для исследования на фруктозу)
- Камеры для предметных стекол, одноразовые (по желанию; для приготовления образцов для КК)
- Спектрофотометр (по желанию; для биохимических анализов эякулята)
- Объект-микрометр (по желанию; для морфологической оценки сперматозоидов)
- Секундомер (по желанию; для приготовления образцов для КК)
- Нагревательная поверхность, настольная (по желанию; для предварительного нагрева предметных стекол при оценке подвижности сперматозоидов)
- Прибор CASA (по желанию).

8.2.1.4 Химические вещества

- Краситель по Папаниколау (рекомендуется)
- Антитела (по желанию; CD45 для лейкоцитов)
- Противовспениватель (по желанию; для приготовления образцов для КК)
- Набор для определения клеточной пероксидазы (по желанию)
- Среда для криоконсервации (по желанию)
- Среда для градиента плотности (по желанию; для препаратов сперматозоидов)
- Набор для оценки содержания фруктозы (по желанию)
- Набор для определения нейтральной α -гликозидазы (по желанию)
- Вазелиновое масло (по желанию)

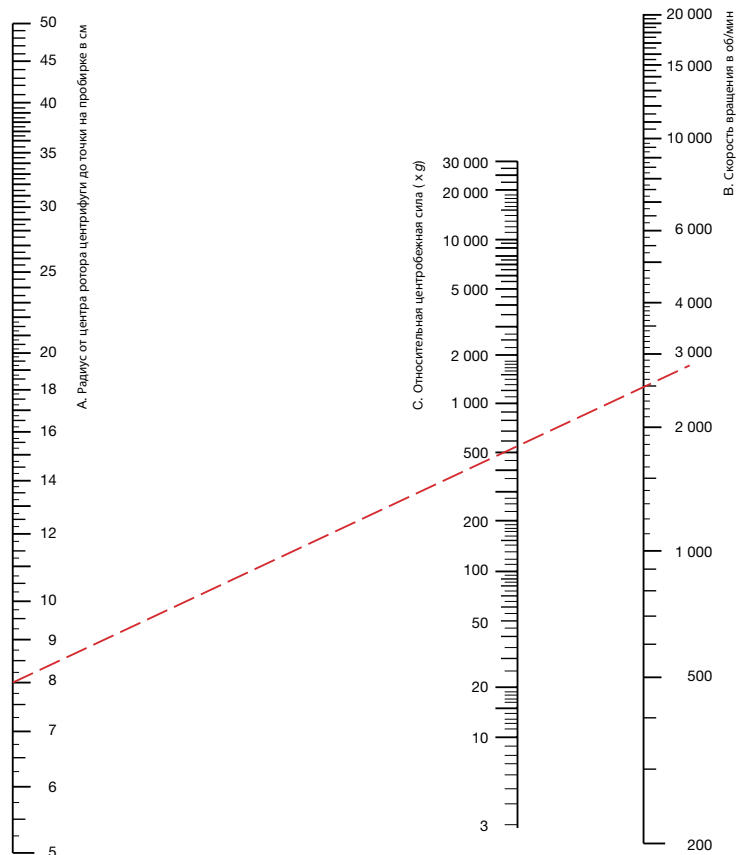
- Набор для быстрого окрашивания (по желанию; для морфологической оценки сперматозоидов)
- Воск (температура плавления 48–66°C) (по желанию)
- Набор для оценки содержания цинка (по желанию).

8.2.2 Расчет центробежных сил

Сила, которая воздействует на сперматозоиды во время центрифугирования (относительное центробежное ускорение, ОЦУ), зависит от скорости вращения (N оборотов в минуту, об/мин) и расстояния от центра ротора до точки, в которой измеряется сила (обычно дно центрифужной пробирки) (радиус, R , см). ОЦУ рассчитывается по формуле: $1,118 \times 10^{-5} \times R \times N^2$. Например, при радиусе ротора 8,6 см центрифугирование при 5000 об/мин создаст силу 2404g; при радиусе ротора 13,5 см центрифугирование при 3900 об/мин создаст силу 2296g. На рис. 8.1 представлена номограмма для определения ОЦУ по радиусу ротора и скорости вращения.

Рис. 8.1 Номограмма для определения центробежной силы по радиусу ротора и скорости вращения

Прямая линия, соединяющая радиус ротора (см, *левая ось*) и скорость вращения (об/мин, *правая ось*), пересекает среднюю ось в точке ОЦУ. В данном примере при радиусе 8 см и скорости вращения 2500 об/мин ОЦУ составляет примерно 550g (расчетное значение составляет 559g.)



8.2.3 Потенциальные биологические риски в андрологической лаборатории

Жидкости организма человека, такие как эякулят, являются потенциально инфекционными, и их следует обрабатывать и утилизировать с особой осторожностью. Для андрологической лаборатории наиболее опасными инфекционными микроорганизмами, которые могут быть обнаружены в семенной жидкости, являются ВИЧ и вирусы гепатита В и С (HBV и HCV). Сотрудники лаборатории должны относиться ко всем биологическим образцам как к потенциально инфекционным и принимать соответствующие меры предосторожности при работе с ними.

8.2.4 Процедуры обеспечения безопасности для сотрудников лаборатории

- Общая рекомендация заключается в том, что сотрудники лаборатории, работающие с образцами человека, должны быть иммунизированы против гепатита В.
- В андрологической лаборатории нельзя есть, пить, курить, наносить косметику или хранить продукты питания.
- Пипетирование ртом не допускается. При обращении с жидкостями всегда следует использовать приборы для механического пипетирования.
- Все сотрудники лаборатории должны носить лабораторную одежду (халат, одноразовый халат или другую одежду, предназначенную для работы в лаборатории), ограниченную рамками лаборатории. Сотрудники должны надевать одноразовые перчатки (резиновые, латексные или виниловые, опудренные или неопудренные), в частности при работе со свежими или замороженными образцами эякулята, семенной плазмы или другими биологическими образцами и любыми контейнерами, которые контактировали с ними. Перчатки необходимо снимать и выбрасывать при выходе из лаборатории и при пользовании телефоном, компьютером или другим оборудованием. Перчатки нельзя использовать повторно.
- Персонал должен регулярно мыть руки, особенно перед выходом из лаборатории, после работы с образцами и после снятия халатов и перчаток.
- Персонал должен принимать меры предосторожности для предотвращения случайных травм острыми инструментами, которые могут быть загрязнены эякулятом, и не допускать контактов эякулята с открытой кожей, порезами, ссадинами или местами других повреждений.
- Следует принимать меры для предотвращения и, при необходимости, локализации разлива образцов эякулята, крови или мочи.
- Все острые предметы (иглы, лезвия и т.д.) после использования необходимо помещать в маркированный контейнер. Этот контейнер следует герметично закрыть до его полного заполнения и утилизировать аналогично другим опасным лабораторным предметам.

- Все потенциально опасные предметы (перчатки, контейнеры для эякулята) должны быть собраны и утилизированы надлежащим образом.
- Все сотрудники, выполняющие процедуры, которые потенциально могут приводить к образованию аэрозолей или капель, например вихревое перемешивание и центрифугирование открытых контейнеров, должны надевать лицевые или хирургические маски. Не следует с силой выдавливать из пипеток последние капли образцов эякулята, поскольку это может приводить к образованию капель или аэрозолей.
- При необходимости, например при работе с жидким азотом (**раздел 8.2.6 на стр. 256**), сотрудники должны надевать закрытые защитные очки, изолирующие перчатки, криофартук и закрытую обувь. Важно, чтобы эти предметы подходили всем сотрудникам по размеру.

8.2.5 Процедуры обеспечения безопасности для лабораторного оборудования

Рабочие поверхности и емкости многоразового пользования, которые контактировали с эякулятом или другими биологическими образцами, должны быть стерилизованы или дезинфицированы. Необходимо выполнять нижеследующие процедуры.

8.2.5.1 Ежедневные процедуры по завершении исследований

- Вымойте рабочее место дезинфицирующим средством, например гипохлоритом натрия 0,1% (1 г/л) или аналогичным дезинфицирующим средством, подождите не менее 1 часа (или оставьте на ночь) и затем смойте дезинфицирующее средство водой.
- Замочите счетные камеры и покровные стекла в гипохлорите натрия 0,1% (1 г/л) или аналогичном дезинфицирующем средстве на ночь и затем смойте дезинфицирующее средство водой.

8.2.5.2 После разлива

- Если внешняя поверхность контейнера для образцов загрязнена, промойте ее дезинфицирующим средством, например гипохлоритом натрия 0,1% (1 г/л) или аналогичным дезинфицирующим средством, и затем ополосните водой.
- Сразу же после разлива какой-либо жидкости обработайте рабочую поверхность дезинфицирующим средством, например гипохлоритом натрия 1,0% (10 г/л) или аналогичным дезинфицирующим средством, подождите не менее 4 часов и затем смойте дезинфицирующее средство водой.

8.2.5.3 Тепловая инактивация ВИЧ в сосудах для сбора эякулята

При необходимости тепловая инактивация ВИЧ в емкостях для сбора эякулята может быть достигнута следующими способами:

- стерилизация в сушильном шкафу в течение не менее 2 часов при температуре 170°C (340°F): накройте алюминиевой фольгой перед нагревом и дайте остыть перед обработкой;
- стерилизация паром (автоклавирование) в течение не менее 20 минут при температуре 121°C (250°F) при давлении 101 кПа (15 фунтов на кв. дюйм, или 1 атмосфера) выше атмосферного давления;
- непрерывное кипячение в течение 20–30 минут.

8.2.6 Меры предосторожности при работе с жидким азотом

- Жидкий азот опасен. При работе с ним всегда принимайте меры предосторожности, используйте только одобренные емкости и не пытайтесь герметически закрывать контейнеры. Для извлечения предметов, погруженных в жидкий азот, используйте щипцы.
- Используйте лицевой щиток или закрытые защитные очки, надевайте изолирующие перчатки, криофартук и закрытую обувь. Все эти предметы должны быть доступны в диапазоне размеров, необходимых для всех сотрудников, работающих в данной области.
- При разливе на поверхности жидкий азот стремится покрыть ее полностью и, тем самым, охлаждает большую площадь. Предметы, мягкие и гибкие при комнатной температуре, при температуре жидкого азота обычно становятся твердыми и хрупкими.
- Экстремально низкие температуры могут привести к серьезным травмам. Попадание жидкости на кожу может вызвать эффект, подобный ожогу. Газ, выделяющийся из жидкости, очень холодный. Он может не оказать воздействия на кожу лица и рук, но деликатные ткани, такие как ткани глаз, могут быть повреждены даже в результате его кратковременного воздействия.
- Держитесь на безопасном расстоянии от кипящего и разбрызгивающегося жидкого азота и выделяющегося из него холодного газа. При заполнении теплого контейнера жидким азотом и погружении в него предметов всегда происходят кипение и разбрызгивание. Для их минимизации всегда выполняйте эти действия медленно.
- Избегайте прикосновений к неизолированным трубам. Никогда не допускайте контакта незащищенной части тела с трубами или сосудами, содержащими жидкий азот. Экстремально холодный металл может быстро прилипнуть к телу, и попытки отсоединить его приведут к разрывам плоти.
- Работайте в хорошо проветриваемых помещениях. Небольшое количество жидкого азота образует большое количество газа (при комнатной температуре примерно в 700 раз больше объема жидкости). При испарении газа из жидкого азота в закрытом помещении процентное содержание

кислорода в воздухе может снизиться, что создаст риск удушья. Существуют кислородные детекторы, которые подают сигнал тревоги, когда уровень кислорода падает ниже 17% (v/v), и их следует использовать в местах хранения жидкого азота.

- Используйте только пробирки и соломины, специально изготовленные для замораживания в жидком азоте. Следует всегда соблюдать осторожность, так как даже они могут взорваться по мере нагревания.
- Весь персонал, задействованный в криогенных процедурах с использованием жидкого азота, должен пройти соответствующее обучение. Для руководителей, ответственных за данную область, соответствующее обучение должно быть организовано внешней стороной или поставщиком оборудования для жидкого азота.

8.3 Микроскопия для базового исследования эякулята

8.3.1 Справочная информация

Лучшим источником информации для конкретного микроскопа является руководство производителя, которое должно содержать схему с указанием всех деталей. При отсутствии такого руководства информацию о настройке и использовании микроскопа можно найти в Интернете.

Для выполнения оценок эякулята, описанных в настоящем руководстве, рекомендуется использовать фазово-контрастный микроскоп. Микроскоп предпочтительно должен быть бинокулярным (иметь два окуляра), с фазовым конденсором; он должен быть оснащен фазовыми объективами $\times 10$, $\times 20$ (или $\times 25$) и $\times 40$ (или $\times 63$) (для общей оценки, оценки подвижности и подсчета сперматозоидов и других клеток) и светосильным объективом $\times 100$ с масляной иммерсией (для оценки морфологии и жизнеспособности).

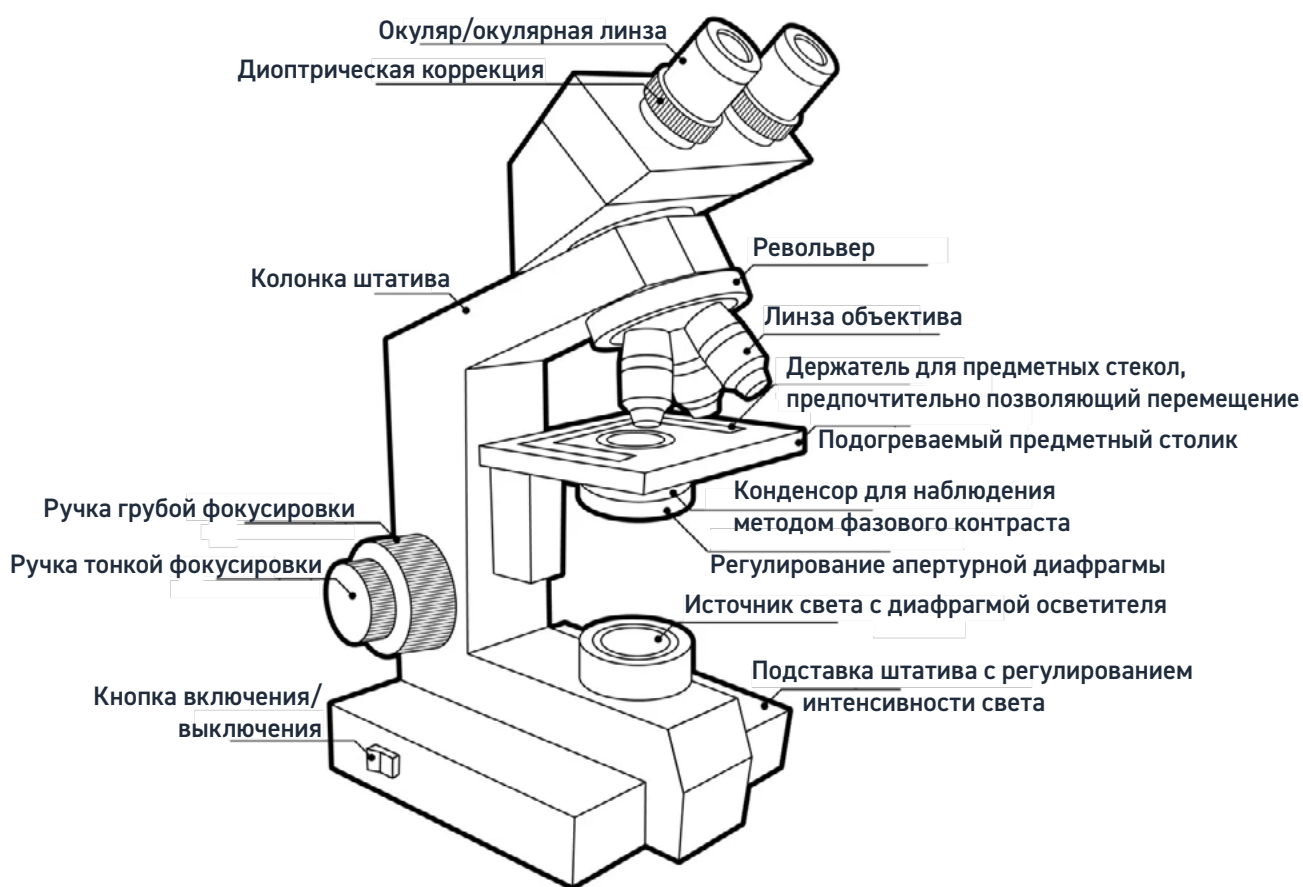
- Качество и цена объективов значительно различаются. Более дорогие объективы дают лучшее изображение, но и менее качественные объективы могут быть вполне пригодными. Следует учитывать, что при использовании высококачественных объективов лабораторная работа может приводить к меньшему напряжению для глаз сотрудников.
- Окулярные сетки (окулярные шкалы, окулярные микрометры) – это стеклянные диски с нанесенными на них шкалами известных размеров, обычно 5 мм или 10 мм, или сетками различных форм. Некоторые окуляры имеют постоянно установленные сетки; другие можно открутить, чтобы вставить сетку. Сетки бывают разных диаметров и должны точно соответствовать диаметру окуляра. Они могут быть откалиброваны с помощью микрометра для определения размеров сперматозоидов. Сетки также используются для ограничения области поля, оцениваемой на предмет подвижности сперматозоидов. Сетка, показанная на **рис. 2.4 на стр. 32** и **рис. 8.4 на стр. 277**, имеет размер 5 мм \times 5 мм, что является подходящим размером для оценки подвижности сперматозоидов при увеличении как $\times 20$, так и $\times 40$. Некоторые лаборанты отдают предпочтение этой сетке вместо сетки 10 мм \times 10 мм и при оценке концентрации или морфологии.



- Объект-микрометр представляет собой модифицированное предметное стекло микроскопа с выгравированной на его поверхности шкалой, обычно 1 мм, и ценой каждого деления 10 мкм. Он может использоваться для калибровки окулярного микрометра или сетки, а также для оценки параметров, например при исследовании подвижности сперматозоидов (рис. 8.5 на стр. 277).

Описанная ниже процедура обеспечивает получение наиболее оптимального изображения под микроскопом. Если световой поток правильно выровнен и отрегулирован, изображение будет ясным, четким и с меньшей вероятностью вызовет напряжение глаз. При использовании нового микроскопа или получении изображений плохого качества необходимо выполнить нижеследующие процедуры.

Рис 8.2 Устройство микроскопа



8.3.1.1 Линза объектива

На каждую линзу микроскопа нанесена информация, такая как:

UPlanFl	PlanApo	Plan Neofluor	Plan	S Fluor
20×/0.80 imm corr	40×/0.75 Ph2	100×/1.35 oil iris	100×/1.25 oil Ph3	20×/0.75∞/0.17
160/0.17	∞/0.17	∞/-	∞/0.17 WD 1.0	

Plan: планарная линза, обеспечивающая плоское поле зрения, в котором все находится в фокусе.

Apo: апохроматическая линза с высокой коррекцией хроматических aberrаций.

F, Fl, FL, Neofluor, Fluo, Fluotar, UV, S-Fluor: линза, пропускающая ультрафиолетовые лучи.

100×, 63×, 40× и т.д.: увеличение линзы.

0.30, 0.50, 0.80, 1.30, 1.40 и т.д.: числовая апертура (NA) линзы. Это показатель светособирающей способности линзы. Вместе с длиной волны используемого света NA определяет разрешение (кратчайшее расстояние между двумя объектами, которые можно различить как отдельные). Для получения наилучшего разрешения выбирайте наибольшее значение NA.

Ph, Ph1, Ph2, Ph3, NP, N: обозначает линзу с фазовым кольцом. Ph обозначает кольца с положительной фазой, а NP или N – с отрицательной. Для линз Ph1, Ph2 и Ph3 требуются разные фазовые кольца в конденсоре. Оптика с положительным фазовым контрастом позволяет наблюдать внутриклеточные структуры (используется для влажных препаратов и оценки подвижности), а оптика с отрицательным фазовым контрастом дает белые изображения на темном фоне (используется для оценки жизнеспособности во влажных препаратах и для CASA).

Imm, immersion, oil, W: обозначает линзу, предназначенную для работы с жидкостью – часто маслом, водой (W) или глицерином, – находящейся между объектом и линзой, для получения более четкого изображения. (Если это не указано, линза является «сухой» и не должна использоваться с жидкостью.)

Iris: обозначает линзу с диафрагмой, управляемой кольцом с насечкой.

Corr: обозначает линзу с коррекционным кольцом с насечкой, позволяющим использовать иммерсионные среды с различными показателями преломления.

160, ∞: длина тубуса или расстояние между окуляром и объективом. Раньше это расстояние обычно составляло 160 мм, но в большинстве современных линз оно равно бесконечности (∞).

0.17, -: толщина покровного стекла, необходимая для объектива. Для большинства целей подходят покровные стекла № 1,5 (толщина 0,16–0,19 мм). Для гемоцитометров необходимы покровные стекла № 4 (толщина 0,44 мм). «-» означает, что толщина покровного стекла не имеет значения или что



иммерсионная жидкость может быть добавлена непосредственно на предметное стекло.

WD: рабочее расстояние – это расстояние от переднего элемента линзы объектива до ближайшей поверхности покровного стекла, при котором образец находится в четком фокусе. WD обычно уменьшается по мере возрастания увеличения и NA, и в этой связи рабочее расстояние объектива может быть нормальным (NWD, до 5 мм), длинным (LWD, 5,25–9,75 мм), сверхдлинным (ELWD, 10–14 мм) и супердлинным (SLWD, 15 мм). При работе с усовершенствованной камерой Нейбауэра для некоторых микроскопов может потребоваться линза LWD.

Показатель преломления: степень фазовой задержки света при прохождении через среду. Показатель преломления (RI, n) вакуума равен 1,0000, воздуха – примерно 1,0 (1,0008), воды – 1,33, глицерина – 1,47, а большинства иммерсионных масел – 1,515. Среды для заключения препаратов после высыхания имеют RI (1,488–1,55), аналогичный RI стекла (1,50–1,58).

8.3.2 Настройка микроскопа

8.3.2.1 Установка образца или объект-микрометра для правильной фокусировки

1. Поместите 10 мкл эякулята на предметное стекло микроскопа, накройте покровным стеклом 22 мм × 22 мм (толщина № 1,5, 0,17 мм) и установите предметное стекло на предметном столике. Для настройки микроскопа вместо предметного стекла с эякулятом можно также использовать объект-микрометр.
2. Включите свет и настройте его на интенсивность, обеспечивающую максимальную контрастность и при этом комфортную для глаз.



Примечание. Если микроскоп тринокулярный (т.е. имеет третий окуляр, к которому можно присоединить камеру для фото- или видеосъемки), на нем имеется ручка отклонения света, которая обычно расположена справа от окуляров. Эта ручка, скорее всего, имеет три настройки: одна позволяет направить весь свет на окуляры, вторая – на камеру, а третья позволяет отклонить половину света на окуляры, а половину направить на камеру.

3. Выберите объектив с положительной фазой ×10. Поверните колесо конденсора до обеспечения соответствия с мощностью выбранного объектива.

8.3.2.2 Регулировка окуляров

Раздвигайте или сдвигайте окуляры, чтобы отрегулировать расстояние между ними под свои глаза.



8.3.2.3 Фокусировка изображения

1. Поверните ручку грубой фокусировки, чтобы приблизить предметный столик как можно ближе к объективу $\times 20$ или $\times 40$. Во избежание поломки объектива или предметного стекла смотрите на объектив и предметный столик спереди или сбоку, а не через окуляры. С помощью грубой фокусировки отрегулируйте высоту столика так, чтобы предметное стекло почти соприкасалось с объективом. Обратите внимание, в какую сторону следует повернуть ручку грубой фокусировки, чтобы отодвинуть столик от объектива.
2. Глядя в оба окуляра, медленно поворачивайте ручку грубой фокусировки, постепенно отодвигая столик от объектива до тех пор, пока образец не окажется в приблизительном фокусе. Используйте ручку тонкой фокусировки для достижения наилучшего фокуса.



Примечание. Если фокус трудно найти, попробуйте сфокусироваться на матовых краях предметного стекла, с тем чтобы приблизиться к правильной фокальной плоскости.

8.3.2.4 Фокусировка окуляров

У некоторых микроскопов оба окуляра можно фокусировать независимо друг от друга. У других микроскопов один окуляр фиксированный, а другой можно фокусировать.

1. Регулируемые окуляры обычно маркируются шкалой «+ / 0 / -». Перед началом этого процесса установите окуляр на «0».
2. Если один окуляр фиксированный, смотрите только через него (закройте или прикройте другой глаз).
3. Сфокусируйте изображение образца с помощью ручки тонкой фокусировки. Полезно сфокусироваться на каком-либо неподвижном предмете, например на мертвом сперматозоиде, частице пыли или сетке объект-микрометра.
4. Сфокусируйте регулируемый окуляр, глядя через него и закрыв или прикрыв глаз над фиксированным окуляром. Вращайте кольцо с насечкой у основания окуляра в сторону «+» или «-» до тех пор, пока фокус не станет подходящим для вашего глаза.

8.3.2.5 Фокусировка светового конденсора

1. Закройте диафрагму осветителя поля (над источником света в основании микроскопа).
2. Поднимайте или опускайте конденсор с помощью маленьких ручек слева или справа от блока конденсора, пока края диафрагмы не окажутся в максимально четком фокусе, а круг света не станет маленьким и четким. Это положение обычно достигается, когда конденсор находится в крайнем верхнем положении. Край светового изображения может меняться от синего к красному по мере фокусирования конденсора (хроматическая аберрация), а края конденсора будут оставаться слегка размытыми. Свет может быть отцентрирован или не отцентрирован.





Примечание. Если апертура поля не имеет ирисовой диафрагмы, сфокусируйтесь на каком-либо остром предмете (например острие карандаша), помещенном на источник света.

8.3.2.6 Центрирование конденсора

1. Отцентрируйте диафрагму осветителя поля с помощью ручек для центрирования конденсора. Как правило, эти две ручки (обычно с насечкой) находятся по диагонали спереди или сбоку под конденсором.
2. Как только световое изображение будет отцентрировано, откройте диафрагму осветителя поля таким образом, чтобы свет падал только на поле зрения. Не открывайте диафрагму дальше этого уровня.
3. Закрывайте диафрагму конденсора до тех пор, пока не исчезнут блики.

8.3.2.7 Регулировка фазовых колец

Это делается с помощью центрирующего телескопа, который можно приобрести у производителя микроскопа.

1. Приведите в поле зрения фазовое кольцо в конденсоре, соответствующее используемому объективу.
2. Снимите один окуляр и замените его центрирующим телескопом. Сфокусируйте кольцо центрирующего телескопа, глядя в него и одной рукой держась за его основание, а другой рукой вращая его верхнюю часть. Вращайте ее до тех пор, пока два кольца не окажутся в четком фокусе: одно кольцо темное (фазовое кольцо), а другое светлое (световое кольцо).
3. Выровняйте эти кольца таким образом, чтобы они были концентрическими, поворачивая ручки регулировки фазы, расположенные на фазовом конденсоре. Эти ручки обычно находятся на задней стороне конденсора.
4. Замените центрирующий телескоп окуляром микроскопа.

8.3.2.8 Флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентная микроскопия используется для обнаружения ядер сперматозоидов при проведении чувствительной процедуры подсчета с использованием красителя Hoechst 33342 (**раздел 3.1 на стр. 94**) и оценки акросомной реакции с использованием лектина, меченного FITC (**раздел 4.2.2 на стр. 163**). Спектральные максимумы возбуждающего излучения красителя Hoechst 33342 и FITC составляют 346 нм и 494 нм соответственно, а соответствующие максимумы эмиссионного излучения – 460 нм и 520 нм. Необходима флуоресцентная линза (**раздел 8.3.1.1 на стр. 259**). Каждая модель микроскопа имеет в качестве дополнительного оборудования необходимый набор дихроических зеркал и барьерных фильтров, необходимых для исследований с применением этих красителей.



8.4 Исходные растворы и среды

Для приготовления всех растворов, используемых для исследования функции сперматозоидов *in vitro*, требуется очищенная вода (дистиллированная, бидистиллированная или деионизированная H₂O) (для сред, используемых для тканей, предназначенных для целей вспомогательной репродукции, следует использовать воду соответствующего качества для выращивания клеточных культур). В настоящем издании не рекомендуется использовать среду Хэма F10 с учетом ее известного негативного воздействия на сперматозоиды, их функцию и, возможно, на результаты исследования (431).

При работе со сперматозоидами решающее значение имеют pH (обычно pH 7,4) и осмолярность среды.

8.4.1 Буферирование pH среды

pH культуральной среды можно контролировать с помощью буферных молекул, чаще всего HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), или стандартной 25 мМ бикарбонатной буферной системы. Бикарбонатное буферирование обеспечивает такое же равновесие, как и кислотно-основной гомеостатический механизм в живых тканях; в его процессе углекислый газ (CO₂) взаимодействует с водой (H₂O) с образованием угольной кислоты (H₂CO₃), которая, в свою очередь, быстро диссоциирует на бикарбонат-ион (HCO₃⁻) и ион водорода (H⁺), как видно из следующей реакции равновесия:



Добавление 25 мМ бикарбоната в среду, уравновешенную правильным процентным содержанием CO₂, позволяет закрепить/буферизировать pH среды.

Следует отметить, что правильное процентное содержание CO₂ для получения pH 7,4 зависит от парциального давления CO₂ и поэтому, что особенно важно, изменяется в зависимости от положения над уровнем моря. Поэтому часто упоминаемые 5% CO₂ актуальны только на уровне моря, и для достижения правильного pH следует проводить местную корректировку (компенсацию) pCO₂ (через посредство процентного содержания CO₂) (432).

8.4.2 Приготовление среды и осмолярность

Осмолярность¹¹ или осмоляльность¹² среды имеет решающее значение для поведения в ней любых клеток. Поэтому эту ключевую переменную необходимо учитывать, если среда приготавливается собственными силами, а не приобретается на коммерческой основе. Ее также всегда следует запрашивать/определять при покупке любой коммерческой среды.

Стандартной для эякулята является среда в диапазоне 280–295 мОсм (миллиосмолей) (кроме раствора для теста с использованием

¹¹ Количество осмотических частиц на объем растворителя.

¹² Количество осмотических частиц на массу растворителя. Когда растворителем является вода, осмолярность и осмоляльность практически идентичны.

гипоосмотического набухания). До достижения необходимой осмолярности с помощью описанных составов обычно производится конечный объем, а затем медленно добавляется ингредиент в избытке, как правило, безводный хлорид натрия. Это является предпочтительным вариантом в случае, если для этих измерений имеется осмометр. В представленных формулах предлагается «приготовить до 1000 мл», поэтому при отсутствии осмометра возможно близкое приближение.

Вместе с тем необходимо помнить, что осмоляльность быстро увеличивается *in vitro* в эякулятах, собранных в контейнер для образцов и оставленных для разжижения. Сперматозоиды *in vitro* приспособляются к повышению осмоляльности, и это означает, что воздействие среды с осмоляльностью 280–290 мОсм на адаптированных сперматозоидов приводит к их относительному гипоосмотическому шоку, что может снизить подвижность и результаты ЦГП (147).

8.4.3 Спецификации химических веществ/ ингредиентов среды

Ниже приведены химические вещества с их наиболее распространенными уровнями гидратации при покупке. Некоторые химические вещества, например CaCl_2 , могут быть доступны с разными уровнями гидратации (например безводный CaCl_2 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Если используется вещество с другим уровнем гидратации, измеренные веса должны быть соответствующим образом скорректированы для достижения правильной молярности. Необходимо также отметить, что многие из этих химических веществ гигроскопичны, поэтому крайне важно обеспечить их правильное хранение и соблюдать сроки годности – в противном случае будет получена неправильная среда.

Предполагается, что химические вещества, используемые для этих исследований, должны как минимум обладать качеством, необходимым для выращивания клеточных культур.

Во многие перечисленные среды требуется добавлять сыворотку. Как правило, для диагностических сред предлагается добавлять BSA (фракция V), обычно поставляемый в виде сухого порошка, поскольку он является более дешевым, стабильным и широко доступным заменителем сыворотки человека. Для таких исследований, как оценка акросомной реакции, в рамках которой оценивается воздействие на функции, сыворотка всегда должна быть без жирных кислот/обезжиренной древесным углем, чтобы повысить однородность партии и избежать воздействия загрязняющих веществ, таких как гормоны. В лабораториях, выполняющих эти исследования на регулярной основе, следует проводить тестирование партий.

Если сперматозоиды используются для лечения, то для применения *in vivo* всегда следует использовать проверенную сыворотку человека (обычно поставляемую в жидком виде). Необходимо соблюдать соответствующие условия хранения и сроки годности.

Среды с феноловым красным в составе имеют эту добавку в качестве простого полезного индикатора pH, который помогает визуально распознать значительные изменения pH. Если планируется проведение флуоресцентных анализов, то обычно рекомендуется отказаться от фенолового красного, поскольку он повышает фоновую флуоресценцию сперматозоидов и среды.



8.4.4 Среда Biggers, Whitten and Whittingham (BWW)

8.4.4.1 Исходный раствор BWW (433)

1. К 1000 мл очищенной воды добавьте 5,54 г хлорида натрия (NaCl), 0,356 г хлорида калия (KCl), 0,294 г гептагидрата сульфата магния ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 0,250 г дигидрата хлорида кальция ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) и 0,162 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4).

2. Доведите pH до 7,4 с помощью 1 моль/л гидроксида натрия (NaOH).

3. Добавьте феноловый красный из расчета 1,0 мл (0,04%, 0,4 г/л) на литр.

Этот раствор можно хранить несколько недель при 4°C.

8.4.4.2 Рабочий раствор BWW

В день использования:

1. Добавьте в 100 мл исходного раствора 210 мг бикарбоната натрия ($NaHCO_3$), 100 мг D-глюкозы, 0,37 мл 60%-ного (v/v) концентрата лактата натрия, 3 мг пирувата натрия, 350 мг альбумина бычьей сыворотки (фракция V), 10 000 единиц пенициллина и 10 мг сульфата стрептомицина.

2. Перед использованием нагрейте до 37°C в атмосфере 5% (v/v) CO_2 , 95% (v/v) воздуха.

3. Для инкубации на воздухе: добавьте 20 ммоль/л HEPES (соль Na: 5,21 г/л) и уменьшите содержание $NaHCO_3$ до 10 ммоль/л (28).

8.4.5 Фосфатно-солевой буферный раствор Дюльбекко (DPBS)

1. Глюкоза-PBS Дюльбекко: к 750 мл очищенной воды добавьте 0,2 г хлорида калия (KCl), 0,2 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4), 0,1 г гексагидрата хлорида магния ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 8,0 г хлорида натрия (NaCl), 2,16 г гептагидрата гидрофосфата динатрия ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) и 1,00 г D-глюкозы.

2. Растворите 0,132 г дигидрата хлорида кальция ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) в 10 мл очищенной воды и медленно добавьте к вышеуказанному раствору при перемешивании.

- Для предотвращения выпадения осадка добавляйте $CaCl_2$ отдельно, медленно и при перемешивании.

3. Доведите pH до 7,4 с помощью 1 моль/л (равно 1 M или 1 N) гидроксида натрия (NaOH).

4. Доведите объем до 1000 мл с помощью очищенной воды.

- При необходимости добавьте перед использованием альбумин бычьей сыворотки (фракция V) из расчета 0,3 г на 100 мл.

8.4.6 Сбалансированный солевой раствор Эрла (EBSS)

1. К 750 мл очищенной воды добавьте 6,8 г хлорида натрия (NaCl), 2,2 г бикарбоната натрия (NaHCO_3), 0,14 г моногидрата дигидрофосфата натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0,4 г хлорида калия (KCl), 0,20 г гептагидрата сульфата магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и 1,0 г D-глюкозы.
2. Медленно растворите 0,23 г хлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) в вышеуказанном растворе при перемешивании.
3. Доведите pH до 7,4 с помощью 1 моль/л соляной кислоты (HCl) или 1 моль/л гидроксида натрия (NaOH).
4. Доведите объем до 1000 мл с помощью очищенной воды.
5. Для инкубации на воздухе: добавьте 20 ммоль/л HEPES (соль Na: 5,21 г/л) и уменьшите содержание NaHCO_3 до 10 ммоль/л (Mortimer and Mortimer, 2014).

8.4.7 Дополненный сбалансированный солевой раствор Эрла (sEBSS)

1. К 750 мл очищенной воды добавьте 6,8 г хлорида натрия (NaCl), 2,2 г бикарбоната натрия (NaHCO_3), 0,14 г моногидрата дигидрофосфата натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0,4 г хлорида калия (KCl), 0,20 г гептагидрата сульфата магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и 1,0 г D-глюкозы.
2. Медленно растворите 0,23 г хлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) в вышеуказанном растворе при перемешивании.
3. Добавьте 3 г альбумина бычьей сыворотки (фракция V).
4. Добавьте 0,30 г пирувата натрия.
5. Добавьте лактат натрия (обычно в виде концентрата D,L-молочной кислоты натрия) до конечной концентрации 19 мМ.
6. Доведите объем до 1000 мл с помощью очищенной воды.

8.4.8 Human tubal fluid (жидкость маточной трубы человека) (HTF)

Первоначальный состав сформулирован в документе Куин и др. (434):

1. К 750 мл очищенной воды добавьте 5,931 г хлорида натрия (NaCl), 0,35 г хлорида калия (KCl), 0,05 г гептагидрата сульфата магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,05 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4), 2,1 г бикарбоната натрия (NaHCO_3), 0,5 г D-глюкозы, 0,036 г пирувата натрия, 0,3 г хлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 4,0 г DL-лактата натрия (60%-ный (v/v) концентрат)¹³.
2. К 1 мл вышеуказанной среды добавьте 10 мкг фенолового красного, 100 единиц пенициллина и 50 мкг сульфата стрептомицина.

¹³ В некоторых опубликованных составах в качестве источника лактата используется лактат кальция (29).

3. Доведите pH до 7,4 с помощью 1 моль/л соляной кислоты (HCl).
4. Доведите объем до 1000 мл с помощью очищенной воды.
5. Для инкубации на воздухе: добавьте 20 ммоль/л **HEPES** (соль Na: 5,21 г/л) и уменьшите содержание NaHCO_3 до 10 ммоль/л.

8.4.9 Трис-буферный солевой раствор (TBS)

1. К 750 мл очищенной воды добавьте 6,055 г трис-основания и 8,52 г хлорида натрия (NaCl).
2. Доведите pH до 8,2 с помощью 1 моль/л соляной кислоты (HCl).
3. Доведите объем до 1000 мл с помощью очищенной воды.

8.4.10 Раствор Тироде

1. К 750 мл очищенной воды добавьте 0,2 г безводного хлорида кальция (CaCl_2), 0,2 г хлорида калия (KCl), 0,05 г гидрофосфата динатрия (Na_2HPO_4), 0,2 г гексагидрата хлорида магния ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 8,0 г хлорида натрия (NaCl), 1,0 г бикарбоната натрия (NaHCO_3) и 1,0 г D-глюкозы.
2. Доведите pH до 7,4 с помощью 1 моль/л соляной кислоты (HCl) или 1 моль/л гидроксида натрия (NaOH).
3. Доведите объем до 1000 мл с помощью очищенной воды.
4. При необходимости добавьте перед использованием альбумин бычьей сыворотки (фракция V) из расчета 0,3 г на 100 мл.

8.4.11 Краситель по Папаниколау

В продаже имеются красители, как правило, удовлетворительного качества, но его можно также приготовить в лаборатории.



Примечание. Проверьте кислотность очищенной воды перед приготовлением разных концентраций этанола. pH должен составлять 7,0.

8.4.11.1 EA-36 (эквивалент EA-50)

Компоненты

- Эозин Y (цветовой индекс 45380) 10 г
- Бисмарк коричневый Y (цветовой индекс 21000) 10 г
- Светло-зеленый SF, желтоватый (цветовой индекс 42095) 10 г
- Очищенная вода 300 мл

- Этанол 95%-ный (v/v) 2000 мл
- Фосфорновольфрамовая кислота 4 г
- Насыщенный водный углекислый литий (более 1,3 г/100 мл) 0,5 мл

Исходные растворы

Приготовьте отдельные 10%-ные (100 г/л) растворы каждого из красителей следующим образом:

1. Растворите 10 г эозина Y в 100 мл очищенной воды.
2. Растворите 10 г Бисмарка коричневого Y в 100 мл очищенной воды.
3. Растворите 10 г светло-зеленого SF в 100 мл очищенной воды.

Приготовление

1. Для приготовления 2 литров красителя смешайте перечисленные выше исходные растворы следующим образом:

- 50 мл эозина Y
 - 10 мл Бисмарка коричневого Y
 - 12,5 мл светло-зеленого SF.
2. Доведите объем до 2000 мл с помощью 95%-ного (v/v) этанола.
 3. Добавьте 4 г фосфорновольфрамовой кислоты.
 4. Добавьте 0,5 мл насыщенного раствора углекислого лития.
 5. Тщательно перемешайте и храните при комнатной температуре в темно-коричневых плотно закупоренных бутылках.



Примечание 1. Раствор остается стабильным в течение 2–3 месяцев.



Примечание 2. Перед использованием пропустите через фильтр с порами 0,45 мкм.

8.4.11.2 Оранжевый G6**Компоненты**

- Кристаллы оранжевого G (цветовой индекс 16230) 10 г
- Очищенная вода 100 мл
- 95%-ный (v/v) этанол 1000 мл
- Фосфорновольфрамовая кислота 0,15 г



Исходный раствор № 1 (оранжевый G6, 10%-ный (100 г/л) раствор)

1. Растворите 10 г кристаллов оранжевого G в 100 мл очищенной воды.
2. Хорошо встряхните. Перед использованием дайте постоять в темно-коричневой или покрытой алюминиевой фольгой бутылке при комнатной температуре в течение 1 недели.

Исходный раствор № 2 (оранжевый G6, 0,5%-ный раствор)

1. К 50 мл исходного раствора № 1 добавьте 950 мл 95%-ного (v/v) этанола.
2. Добавьте 0,15 г фосфорновольфрамовой кислоты.
3. Тщательно перемешайте. Храните в темно-коричневых или покрытых алюминиевой фольгой бутылках с пробками при комнатной температуре.

**Примечание 1.** Перед использованием отфильтруйте.**Примечание 2.** Раствор остается стабильным в течение 2–3 месяцев.**8.4.11.3 Гематоксилин Харриса без уксусной кислоты****Компоненты**

- Гематоксилин (темные кристаллы; цветовой индекс 75290)
- 95%-ный (v/v) этанол
- Додекагидрат сульфата алюминия-аммония ($\text{AlNH}_4(\text{S}_4\text{O}_2) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
- Окись ртути (HgO).

Приготовление

1. Растворите 160 г сульфата алюминия-аммония в 1 600 мл очищенной воды при нагревании.
2. Растворите 8 г кристаллов гематоксилина в 80 мл 95%-ного (v/v) этанола.
3. Добавьте раствор гематоксилина к раствору сульфата алюминия-аммония.
4. Нагрейте смесь до 95°C.
5. Снимите смесь с нагревательного прибора и медленно добавьте 6 г окиси ртути при перемешивании.

**Примечание.** Раствор будет темно-фиолетового цвета.

6. Сразу же погрузите контейнер в емкость с холодной водой.
7. Когда раствор остынет, отфильтруйте.
8. Храните в темно-коричневых или покрытых алюминиевой фольгой бутылках при комнатной температуре.



9. Перед использованием дайте отстояться в течение 48 часов.
10. Разведите необходимое количество равным количеством очищенной воды.
11. Снова отфильтруйте.

8.4.11.4 Водозамещающий раствор Скотта



Примечание. Раствор Скотта используют только тогда, когда обычной водопроводной воды недостаточно для возвращения ядрам синего цвета; его следует часто менять, например после ополаскивания 20–25 предметных стекол.

Компоненты

- 3,5 г бикарбоната натрия (NaHCO_3)
- 20,0 г гептагидрата сульфата магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Несколько кристаллов тимола (если требуется в качестве консерванта)
- 1000 мл очищенной воды.

8.4.11.5 Кислотный раствор этанола

Компоненты

- 300 мл 99,5%-ного (v/v) этанола
- 2,0 мл концентрированной соляной кислоты (HCl)
- 100 мл очищенной воды.

8.5 Образец формы для записи результатов исследования эякулята

Приведенная ниже форма для записи результатов предлагается в качестве образца. Она позволяет регистрировать наблюдения, сделанные во время исследования эякулята с использованием методов, описанных в данном руководстве. Она также включает производные переменные, которые являются комбинированными результатами, полученными на основе первичных данных. Для обеспечения прослеживаемости необходимо отмечать, какой сотрудник выполнял ту или иную часть всей процедуры, начиная с приема пациента и проведения исследования и заканчивая подсчетами после исследования и представлением результатов.

Образец формы для записи результатов содержит несколько колонок для записи результатов исследований эякулята, проведенных в разное время. Это удобный способ представления результатов серии последовательных исследований эякулята. Представляется целесообразным предусмотреть дополнительное место в некоторых частях формы, с тем чтобы можно было записывать комментарии и замечания, которые не могут быть закодированы. Уровни принятия решений, если таковые имеются и применимы, приведены в квадратных скобках.



Таблица 8.4 Образец формы для записи результатов исследования эякулята

ФИО пациента	Дата			
Дата рождения, другие идентификационные данные	Идентификатор образца			
Направившая клиника/врач/дата направления				
Информация со слов пациента	Количество дней воздержания			
Образец собран в лаборатории?	Да/Нет			
Образец собран полностью?	Да/Нет; если нет, то какая часть отсутствует?			
Время сбора образца	час:мин			
Время доставки образца (если образец собран не в лаборатории)	час:мин			
Наличие тяжелых инфекций/воспалительных заболеваний за последние 6 месяцев				
Прием лекарств в случае тяжелых или хронических заболеваний				
Объем эякулята (мл)	Чистый вес эякулята			
Время начала исследования	час:мин			
Время до проведения исследования	час:мин			
Макроскопическое исследование эякулята				
Внешний вид (1, нормальный; 2, аномальный)				
Вязкость (1, нормальная; 2, аномальная)				
Разжижение (1, нормальное; 2, аномальное (минут))				
Обработка (например для того, чтобы вызвать разжижение)				
Микроскопическое исследование эякулята				
Агрегация (0, отсутствует; 1, в некоторой степени; 2, в значительной степени)				
Агглютинация				
pH				
Число сперматозоидов				
Общее число (10^6 на эякулят)				
Концентрация (10^6 на мл)				
Ошибка (%), если подсчитано менее 400 клеток				
Подвижность				
Быстрые прогрессивно подвижные (a) (%)				
Медленные прогрессивно подвижные (b) (%)				
Непрогрессивно подвижные (c) (%)				
Неподвижные (d) (%)				

Общая процентная доля подвижных сперматозоидов (a+b+c) (%)			
Общая процентная доля прогрессивно подвижных сперматозоидов (a+b)			
Жизнеспособность			
Жизнеспособность (если подвижных сперматозоидов менее 40%) (% живых сперматозоидов)			
Морфология			
Нормальные формы (%) (или типичные, или идеальные)			
С аномальной головкой (%)			
С аномальной средней частью (%)			
С аномальным хвостом (%)			
С избыточной остаточной цитоплазмой (%)			
Индекс тератозооспермии (ИТЗ)			
Клетки, отличные от сперматозоидов			
Пероксидаза-положительные клетки, концентрация (10^6 на мл)			
Функция добавочных половых желез			
Цинк (мкмоль на эякулят) $\geq 2,4$			
Фруктоза (мкмоль на эякулят) ≥ 13			
α -гликозидаза (нейтральная) (МЕ на эякулят) ≥ 20			
Дополнительные комментарии			
Результаты исследования разрешены для выдачи (ФИО)			

8.6 Материал для КК

8.6.1 Приготовление образцов эякулята для контроля качества

В идеале образцы для КК должны быть репрезентативными для всего спектра образцов эякулята, обрабатываемых в лаборатории. Если исследованию подлежит лишь небольшое число образцов для КК, то эти образцы должны иметь наибольшее отношение к основной деятельности лаборатории. Например, в лаборатории службы по лечению бесплодия можно выбрать клинически значимые диапазоны (концентрация 15×10^6 – 50×10^6 на мл, прогрессивная подвижность 30–50% и нормальная морфология менее 5%).

- Аликвоты из пула образцов эякулята можно хранить охлажденными при 4°C с консервантом и через определенные промежутки времени исследовать на концентрацию сперматозоидов (**раздел 8.6.3 на стр. 278**).
- После криоконсервации сперматозоиды могут быть недостаточно подходящим источником материала для внутреннего и внешнего КК исследований на подвижность и антиспермальные антитела.



- Видеофрагменты, полученные при тех же уровнях разрешения и увеличения, которые используются при ежедневной оценке подвижности, можно распространять либо на установленных носителях (например DVD, CD, карты памяти), либо путем потоковой передачи из источника, доступного в Интернете. В последнем случае важно, чтобы пропускная способность и соединение обеспечивали бесперебойную загрузку с достаточными уровнями разрешения и увеличения.
- Для морфологической оценки сперматозоидов можно использовать фотографии и видеофрагменты.
- Видеозаписи особенно полезны для обучения в области проведения оценки подвижности и морфологии, но их использование должно дополнять, а не заменять повторные оценки образцов эякулята.
- Предметные стекла с окрашенными мазками эякулята можно использовать для КК морфологической оценки. Фиксированные мазки можно также хранить и использовать для контроля окрашивания. Окрашенные мазки могут ухудшаться со временем в зависимости от качества процедур фиксации или окрашивания. Вместе с тем предметные стекла с мазками, окрашенными по методике Папаниколау, описанной в настоящем руководстве, и хранящиеся в темноте при комнатной температуре, могут сохраняться в течение нескольких месяцев и даже лет.
- Положительная на антиспермальные антитела сыворотка может быть использована для КК косвенных ИВ-тестов, но не рекомендуется для использования применительно к прямым ИВ-тестам.

8.6.2 Создание видеозаписи для внутреннего контроля качества исследования подвижности сперматозоидов

В этом протоколе приводится описание процесса создания видеозаписи для использования в целях контроля качества оценки подвижности сперматозоидов, выполненной ручным методом.

- Создайте видеозапись не менее пяти полей, с тем чтобы имитировать многочисленные поля, изучаемые при оценке подвижности в рамках исследования эякулята, и чтобы можно было оценить не менее 400 сперматозоидов.
- Видеозапись должна содержать изображения нескольких разных образцов эякулята, охватывающих все типы подвижности сперматозоидов, обычно наблюдаемые в рамках рутинного исследования эякулята.
- Видеозапись может просто содержать пять полей нескольких разных образцов эякулята; в других случаях может потребоваться более сложная запись, например в целях стандартизации на межлабораторном уровне или при проведении многоцентрового исследования. В этом случае может быть использовано большее число образцов эякулята, и образцы могут повторяться случайным образом на протяжении всей видеозаписи. Повторное включение образцов позволяет оценить точность результатов, полученных конкретным лаборантом.

8.6.2.1 Дополнительное оборудование

При создании видеозаписей для КК в дополнение к обычному оборудованию для оценки подвижности требуется обеспечить возможность для просмотра видеофрагментов с помощью надлежащей фазово-контрастной микроскопии и для редактирования с помощью любого подходящего программного обеспечения, позволяющего разделять поля и нумеровать записанные образцы при наличии или без калиброванной сетки.

8.6.2.2 Процедура

1. Если имеется несколько образцов эякулята, вся видеозапись может быть сделана за один раз; в противном случае образцы можно записывать по мере их поступления.
2. Если подвижность обычно оценивается, как рекомендовано, при 37°C, то запись следует проводить при той же температуре с использованием обогревателя предметного столика. Аналогичным образом, если подвижность обычно оценивается при комнатной температуре, запись следует проводить при комнатной температуре.



Примечание. Если запись должна проводиться при температуре 37°C, обогреватель предметного столика следует включить не менее чем за 10 минут до использования для достижения стабильной температуры.

3. Приготовьтесь к записи не менее 10 полей, с тем чтобы записать 400 сперматозоидов в 5 разных образцах эякулята.
4. Для получения достаточного количества сперматозоидов для подсчета в образцах с низкой концентрацией может потребоваться более 10 полей. Видеозапись 10 полей займет несколько минут.
5. Видеозапись можно проводить как на предметном стекле с покровным стеклом, так и в фиксированной камере глубиной 20 мкм.



Примечание 1. При использовании одноразовых предметных стекол счетной камеры подвижность сперматозоидов будет стабильной в течение более длительного периода времени, чем при использовании предметных и покровных стекол. Это позволит записать все 10 (или более) полей, используя один и тот же препарат.



Примечание 2. При использовании предметных и покровных стекол во избежание заметного снижения подвижности сперматозоидов во время видеозаписи может потребоваться несколько препаратов.

6. Определите несколько образцов эякулята с разными значениями подвижности сперматозоидов.

7. На видеозаписи каждый образец должен иметь свой уникальный код. Кодирование может варьироваться от простой маркировки каждого образца до маркировки каждого поля каждого образца. Например, маркер первого образца может находиться в начале первого поля, и до появления второго образца никакое другое кодирование не используется. В качестве альтернативного варианта кодирование может включать маркировку каждого отдельного поля, т.е. первое поле первого образца будет обозначено 01-01, второе поле первого образца будет обозначено 01-02 и т.д. Такая более сложная система маркировки помогает лаборантам проследить место оценки в процессе исследования.



Примечание 1. При использовании одноразовых предметных стекол счетной камеры подвижность сперматозоидов будет стабильной в течение более длительного периода времени, чем при использовании предметных и покровных стекол. Это позволит записать все 10 (или более) полей, используя один и тот же препарат.



Примечание 2. Самый простой способ получения пустого сегмента при записи – закрыть источник света.



Примечание 3. Это также можно делать перед приостановкой записи; всегда следует использовать кнопку «пауза», а не кнопку «стоп», поскольку кнопка «стоп» может вызвать шум на записи.

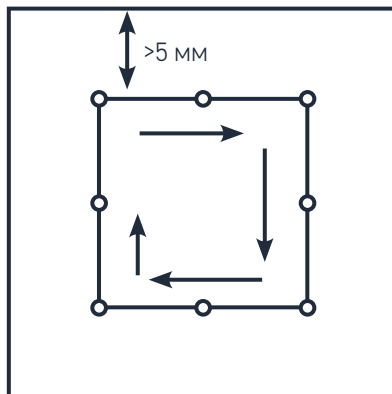
8. Записывайте изображение объект-микрометра в течение 10 секунд при том же увеличении, при котором будет проводиться запись образцов. Увеличение должно обеспечивать такое же изображение на мониторе, как и при визуальном микроскопическом исследовании. Изображение объект-микрометра дает постоянную запись увеличения, что позволяет калибровать наложенную на экран ацетатную сетку, используемую во время анализа видеозаписи или калибровки прибора CASA.

9. Записывайте изображение кода для первого образца в течение 5–7 секунд. По истечении этого времени закройте источник света на 3 секунды, чтобы получить отсутствие изображения, которое будет служить маркером, и затем приостановите запись.

10. Определите первый образец эякулята, который будет использоваться для записи. Поместите 10 мкл тщательно перемешанного эякулята на предметное стекло и накройте его покровным стеклом размером 22 мм × 22 мм или загрузите 7 мкл тщательно перемешанного эякулята в фиксированную камеру. Подождите нескольких секунд (при необходимости при 37°C) до прекращения растекания эякулята. Записывайте 10 или более полей, следуя схеме, изображенной на рис. 8.3. Для КК CASA концентрация сперматозоидов не должна превышать 50×10^6 на мл; для более концентрированных образцов может потребоваться разведение в гомологичной семенной плазме.

Рис. 8.3 Схема проведения оценки подвижности сперматозоидов

Последовательное изучение полей для создания видеозаписи подвижности сперматозоидов на расстоянии не менее 5 мм от краев покровного стекла.



11. Выберите первое поле вблизи верхнего левого участка покровного стекла или камеры на расстоянии не менее 5 мм от края. Записывайте это поле в течение 15 секунд, обеспечивая максимально возможную неподвижность микроскопа и предметного столика. Через 15 секунд записывайте отсутствие изображения в течение 3 секунд и приостановите запись. При кодировании отдельных полей измените кодовый номер и записывайте изображение, содержащее только кодовый номер, в течение 5–7 секунд.
12. Следуя схеме, показанной на рис. 8.3, определите второе поле для оценки подвижности сперматозоидов на предметном стекле или в камере и записывайте это поле в течение 15 секунд. По истечении 15 секунд снова записывайте отсутствие изображения в течение 3 секунд. Приостановите запись и, при желании, измените кодовый номер для обозначения третьего поля. Продолжайте запись таким же образом, пока не будет записано в общей сложности не менее 400 сперматозоидов (10 полей или более в зависимости от концентрации). После записи последнего поля и трехсекундного отсутствия изображения остановите запись.
13. Подготовьте второй образец. Записывайте изображение кода для второго образца в течение 5–7 секунд с последующим трехсекундным отсутствием изображения.
14. Создайте запись второго образца в соответствии с вышеописанными шагами, записывая 10 или более полей по 15 секунд каждое с отсутствием изображения перед каждым последующим полем и в конце записи последнего поля.
15. Повторяйте этот процесс до тех пор, пока не будет записано необходимое количество образцов.



Примечание 1. Если требуется более сложная видеозапись подвижности сперматозоидов для ВКК, содержащая случайным образом повторяющиеся образцы, необходимо либо второе записывающее устройство, либо компьютер, оснащенный специализированным программным обеспечением для редактирования видеозаписей.



Примечание 2. В последнем случае каждый образец следует записывать отдельно только с маркированными полями. Номер образца не следует записывать, поскольку он будет меняться при повторении образца для записи.

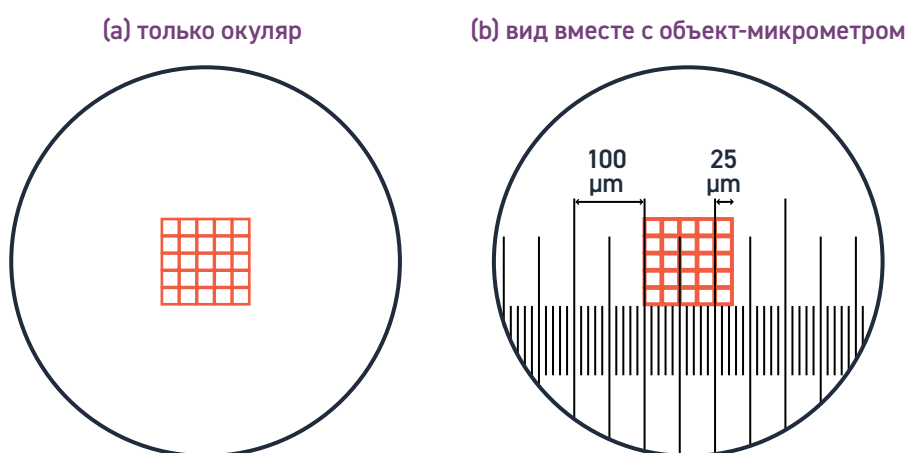


Примечание 3. При наличии компьютера с программным обеспечением для редактирования видеозаписей изображения каждого образца могут по желанию быть оцифрованы и объединены.

8.6.2.3 Анализ видеозаписи

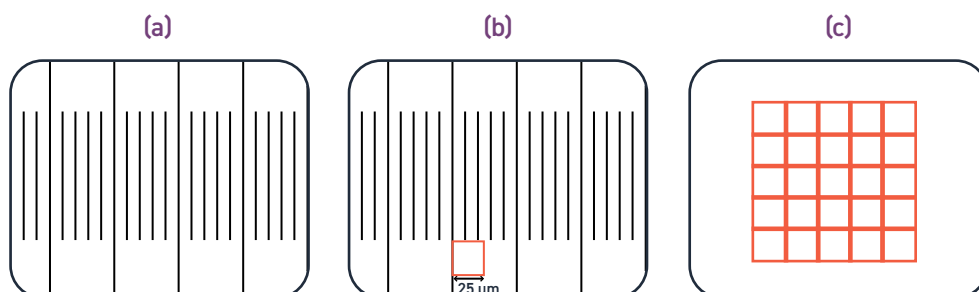
1. Начертите сетку на ацетатной пленке и разместите ее на видеомониторе, который будет использоваться во время анализа видеозаписи, как описано ниже. Это будет имитировать сетку, используемую в окуляре во время микроскопического исследования (рис. 8.4).

Рис. 8.4 Вид через окуляр с сеткой (красный квадрат)



2. Поместите объект-микрометр на столик микроскопа при увеличении, используемом для исследования подвижности сперматозоидов. Глядя в окуляр с сеткой (рис. 8.4), измерьте размер клеток квадрата с помощью объект-микрометра. В данном примере квадрат имеет размер $125 \text{ мкм} \times 125 \text{ мкм}$, а каждая клетка – $25 \text{ мкм} \times 25 \text{ мкм}$. Запишите эти измерения.

Рис. 8.5 Вид видеозаписи изображения объект-микрометра на мониторе и расчерченной накладке



3. Воспроизведите запись через видеомонитор и поставьте на паузу на изображении микрометра (рис. 8.5а).
4. Наклейте ацетатную пленку на экран и начертите квадрат размером с одну клетку сетки окуляра, как измерено выше (см. рис. 8.5b).
5. Дополните полученное изображение, начертив всю сетку окуляра (25 клеток) (рис. 8.5с).
6. Для анализа видеозаписи закрепите накладную ацетатную сетку на видеомониторе. Анализ следует проводить на каком-либо стандартизированном участке наклейки, например в двух верхних или трех средних рядах.
7. Оцените дважды 200 сперматозоидов в каждом записанном сегменте.

8.6.3 Приготовление разведенного эякулята для внутреннего контроля качества оценки концентрации сперматозоидов

8.6.3.1 Общие соображения

- Некоторые этапы процедуры определения концентрации сперматозоидов в эякуляте можно выполнять с использованием разведенных хранящихся образцов эякулята, приготовленных в лаборатории.
- Образцы для ВКК должны быть репрезентативными для всего диапазона концентраций, обычно наблюдаемых в лаборатории при проведении рутинной оценки эякулята.
- Разведите эякулят в консерванте и поместите аликвоты в пробирки для хранения. Их можно хранить в холодильнике и использовать позднее для подсчета. Необходимо проверить герметичность пробирок и убедиться, что эякулят не прилипает к внутренним стенкам.
- При приготовлении суспензии тщательно перемешайте образец, с тем чтобы обеспечить одинаковую концентрацию сперматозоидов в пробирках, приготовленных на основе одного и того же образца. При таком подходе различия в подсчитанных значениях концентрации в образцах для ВКК могут быть отнесены к проблемам в процедуре подсчета.
- Разведите хранящиеся образцы для ВКК еще раз перед оценкой концентрации с использованием гемоцитометра. Конечное разведение должно быть таким, какое используется в лаборатории при обычном подсчете. Благодаря этому концентрация фонового дебриса и других клеток, отличных от сперматозоидов, будет аналогична той, которая наблюдается при обычной оценке. Например, если эякулят первоначально разведен равным объемом консерванта, дополнительное разведение 1+9 (1 : 10) даст конечное разведение 1 : 20.
- Если требуется хранящийся образец с низкой концентрацией сперматозоидов, лучше начать с образца эякулята с низкой концентрацией, а не разводить в значительной мере образец с более высокой концентрацией. Это обеспечит фон, аналогичный тому, который наблюдается при рутинном исследовании эякулята.

- В препаратах сперматозоидов, отобранных методом всплытия, отсутствуют дебрис, свободные головки и фрагменты клеток, наблюдаемые при рутинном исследовании эякулята, и такие препараты лучше использовать только для контроля подсчета применительно к суспензиям сперматозоидов, отобранных аналогичным методом.
- Количество суспензий эякулята для ВКК, приготовленных за один раз, зависит от числа лаборантов и частоты подсчета.
- Разведенный эякулят, хранящийся в холодильнике, должен оставаться стабильным не менее 4 месяцев.

8.6.3.2 Реагенты

Можно использовать любой из двух приведенных ниже консервантов. Такие растворы могут быть загрязнены, поэтому их следует регулярно утилизировать и обновлять.

- Формалин (10%-ный (v/v) формальдегид): к 27 мл очищенной воды добавьте 10 мл 37%-ного (v/v) формальдегида.
- Раствор для предотвращения агглютинации (APSiS) (141): к 100 мл очищенной воды добавьте 1,0 г BSA, 2,0 г поливинилпирролидона (PVP), 0,90 г хлорида натрия (NaCl), 0,1 мл детергента Тритон X-100 и 0,004 мл силиконового противовспенивателя. Тщательно перемешайте и пропустите через фильтр с порами 0,45 мкм для удаления дебриса. Храните при 4°C.



Примечание. В APSiS можно добавлять бактерицидный азид натрия (0,10 г азиды натрия), который сделает раствор токсичным. Но по соображениям безопасности это не рекомендуется.

8.6.3.3 Дополнительные расходные материалы

В дополнение к обычному оборудованию для оценки концентрации сперматозоидов при приготовлении образцов для КК требуются:

- криопробирки или другие небольшие пробирки с плотно прилегающими крышками для хранения
- несмываемые маркеры для маркировки пробирок.

8.6.3.4 Процедура

1. Определите образцы эякулята с примерно необходимой концентрацией. Необходимый объем хранящегося эякулята зависит от потребностей лаборатории; либо используйте весь объем имеющегося эякулята, либо приготовьте по 4 мл разведенной суспензии сперматозоидов с каждой концентрацией.
2. Как можно скорее после сбора эякулята разведите его консервантом. В случае, если для разведения и консервации используется APSiS, чем больше времени проходит до разведения, тем выше вероятность образования

кристаллов после разведения. Эти кристаллы могут препятствовать заполнению камеры и подсчету сперматозоидов.

3. Перенесите необходимый объем эякулята в центрифужную пробирку объемом 15 мл. На каждый мл эякулята добавьте либо 100 мкл 10%-ного (v/v) формалина, либо 10 мкл 3 моль/л азида, либо 1 мл APSIS.
4. Нанесите на все пробирки, которые будут использоваться для хранения образцов, идентификационную информацию и дату приготовления. Крышки или пробки должны быть сняты/вынуты, а пробирки помещены в штатив для быстрого и простого заполнения.
5. Тщательно перемешивайте разведенный эякулят в течение всего процесса распределения, с тем чтобы обеспечить одинаковую концентрацию сперматозоидов во всех пробирках. Даже при незначительных задержках после перемешивания сперматозоиды могут начать оседать, что приведет к изменению концентрации в аликвотах. Один из способов обеспечения постоянного перемешивания заключается в следующем: поместите центрифужную пробирку с разведенным эякулятом в штатив, а затем непрерывно перемешивайте эякулят одной рукой с помощью пластиковой пипетки для переноса материала и одновременно отбирайте аликвоты с помощью пипетки в другой руке.
6. В зависимости от потребностей лаборатории каждая пробирка должна содержать 0,5–1,0 мл. Хранение образцов в аликвотах по 0,5 мл позволяет провести несколько подсчетов из каждой пробирки.
7. После того как разведенная суспензия сперматозоидов будет распределена по всем пробиркам, их следует плотно укупорить. В зависимости от типа используемой пробирки для обеспечения надлежащей герметичности поверхность контакта пробирки с крышкой можно закрыть полоской самогерметизирующейся лабораторной пленки. В случае использования криопробирок это необязательно.
8. Повторите весь процесс для оставшихся образцов эякулята.
9. Храните пробирки при 4°C.



Примечание. Концентрацию растворов для ВКК следует определять после приготовления разведений; не следует исходить из концентрации исходного эякулята. После приготовления суспензий сперматозоидов для хранения пробирки можно при необходимости извлекать и проводить оценку. Результаты можно наносить на график, используя процедуру, описанную в **разделе 7.7 на стр. 229**. Все подсчеты должны проводиться с использованием метода, который обычно применяется в лаборатории. В разделе ниже описана процедура с использованием гемоцитометра.

8.6.3.5 Использование хранящихся образцов для ВКК

- Хранящиеся растворы перед подсчетом необходимо развести; степень разведения зависит от используемого консерванта.

- Разведение эякулята формалином и азидом минимально, поэтому нет необходимости принимать его во внимание. В случае использования APSIS эякулят разводят в два раза (т.е. 1+1 (1 : 2)), и это необходимо учитывать при окончательном расчете концентрации.
- Для разведенных в APSIS суспензий, приготовленных из эякулята с исходной концентрацией более 25 миллионов на мл, подсчет лучше всего проводить с помощью дополнительного разведения 1+9 (1 : 10). Его можно получить путем добавления 50 мкл хранящейся суспензии эякулята к 450 мкл очищенной воды. Это даст конечное разведение эякулята 1 : 20. Не используйте APSIS в качестве разбавителя, так как это будет препятствовать осаждению сперматозоидов на сетке гемоцитометра.
- Для следующих шагов все пипетки должны быть предварительно отрегулированы на соответствующий объем и снабжены чистым наконечником для быстрого отбора аликвот сразу же после перемешивания.
- Необходимо подготовить пробирку для разведения с соответствующим объемом воды (например 450 мкл при разведении 1 : 10, как предложено выше). Содержимое пробирки для хранения следует тщательно перемешать с помощью вихревого миксера в течение приблизительно 30 секунд на максимальной скорости. Затем аликвоту объемом 50 мкл следует перенести в пробирку для разведения, содержащую воду. Содержимое пробирки для разведения следует перемешать вихревым методом в течение 20 секунд на максимальной скорости. 10 мкл суспензии следует поместить в гемоцитометр и подсчитать сперматозоиды, как описано в **разделе 2.4.8 на стр. 33**.
- Если исходный образец эякулята, использующийся для приготовления эякулята для хранения, имеет низкую концентрацию сперматозоидов, разведение для подсчета необходимо скорректировать соответствующим образом. Например, если исходная концентрация сперматозоидов была в диапазоне 4–25 миллионов на мл, для достижения окончательного разведения 1 : 5, как в лаборатории, соответствующее дополнительное разведение законсервированного в APSIS эякулята составит 2 : 5 (2+3, поскольку эякулят уже был разведен APSIS 1+1 (1 : 2)). Этого можно достичь путем разведения 50 мкл хранящегося эякулята в 75 мкл очищенной воды.
- Суспензии сперматозоидов, хранящиеся в холодильнике, должны оставаться стабильными в течение не менее 4 месяцев, после чего следует приготовить новые растворы. Желательно иметь период параллельного использования старых и новых растворов для мониторинга переходного периода.

8.6.4 Подготовка предметных стекол для внутреннего контроля качества морфологической оценки сперматозоидов

8.6.4.1 Общие соображения

- В лаборатории могут быть приготовлены мазки для использования в целях ВКК процедуры окрашивания и анализа в рамках морфологической оценки.
- Из каждого образца эякулята с разной морфологией, оцениваемой в лаборатории, можно приготовить несколько мазков.



- Мазки можно фиксировать и хранить для последующего использования в целях контроля процедур окрашивания и анализа.
- Окрашенные мазки могут быть использованы по отдельности или в нескольких повторениях для контроля качества процедуры морфологического анализа.
- Использование повторных препаратов позволяет определить точность оценки конкретных лаборантов. Эти предметные стекла для КК также целесообразно использовать при сравнении результатов, полученных разными сотрудниками в лаборатории, или при сравнении результатов исследований между лабораториями.
- Окрашенные по Папаниколау и заключенные в среду мазки, хранящиеся в темноте при комнатной температуре, должны оставаться стабильными в течение многих месяцев и даже лет.
- Эякулят следует тщательно перемешивать в течение всего процесса приготовления мазков, с тем чтобы обеспечить идентичность всех мазков, приготовленных на основе конкретного образца эякулята. Такой подход дает основания предполагать, что любые значительные отклонения, выявленные в ходе исследования, являются результатом контролируемого процесса (т.е. процедуры морфологического анализа), а не вызваны ненадлежащим перемешиванием эякулята во время подготовки предметных стекол.

8.6.4.2 Процедура

1. Перенесите эякулят из контейнера для образца в центрифужную пробирку объемом 15 мл. Это позволит проще и тщательнее перемешать ее содержимое в процессе подготовки предметного стекла.
2. Очистите обе поверхности матовых полос предметных стекол, энергично протерев их безворсовыми бумажными салфетками.
3. Нанесите на матовую полосу предметных стекол идентификационную информацию (например идентификационный номер и дату), используя графитовый карандаш HB (номер 2). Карандашные пометки устойчивы при фиксации и окрашивании по Папаниколау в отличие от чернил для ручек и некоторых несмываемых маркеров.
4. Присоедините чистый наконечник к пипетке и отрегулируйте ее объем на 10 мкл (или объем, обычно используемый в лаборатории для приготовления мазков для морфологической оценки).
5. Эякулят необходимо тщательно перемешивать в течение всего процесса, с тем чтобы все мазки были по возможности схожими. После перемешивания даже при незначительной задержке перед отбором аликвоты сперматозоиды начнут осаждаться, что приведет к изменению популяции сперматозоидов на предметном стекле.
6. Тщательно перемешайте образец в центрифужной пробирке, аспирируя его 10 раз в пипетку с широким отверстием (диаметром около 1,5 мм), доведенную до температуры образца. Этот процесс должен быть достаточно

энергичным для перемешивания эякулята, но не настолько энергичным, чтобы образовались пузырьки.

7. Сразу же после перемешивания, чтобы не допустить осаждения сперматозоидов в суспензии, поместите 10 мкл эякулята на прозрачный край одного из очищенных предметных стекол. Важно, чтобы капля эякулята оставалась на предметном стекле не более двух секунд перед размазыванием.
8. Размажьте аликвоту эякулята по поверхности предметного стекла, применяя описанную выше методику (**раздел 2.4.9.1 на стр. 50**). В этой процедуре край второго предметного стекла используется для протягивания капли эякулята по поверхности первого предметного стекла. Используйте второе предметное стекло для того, чтобы «тянуть» эякулят по предметному стеклу, а не «толкать» его сзади. Необходимо следить за тем, чтобы мазки не получались слишком толстыми, иначе сперматозоиды будут перекрывать друг друга или скучиваться, а фоновая окраска будет темнее. Разделение сперматозоидов на предметном стекле зависит от объема эякулята и концентрации сперматозоидов, угла наклона размазывающего предметного стекла (чем меньше угол, тем тоньше мазок) (435) и скорости размазывания (чем быстрее движение, тем тоньше мазок) (436).
9. Повторите шаги 6–8 для остальных предметных стекол, подготавливая только одно предметное стекло после каждого перемешивания, с тем чтобы не допустить осаждения сперматозоидов до отбора аликвоты. Если пауза после перемешивания длится более двух секунд, эякулят следует повторно перемешать перед взятием аликвоты.
10. Если методика приготовления мазков отлажена, после каждого перемешивания можно готовить два или три предметных стекла. Все аликвоты должны быть отобраны сразу же после перемешивания, и два или три мазка должны быть сделаны как можно быстрее, в любом случае в течение нескольких секунд.

8.6.5 Калибровка оборудования

Пипетки, счетные камеры и другое оборудование следует калибровать каждые 6 месяцев или ежегодно.

8.6.5.1 Весы

- Весы следует регулярно проверять с помощью внутренних калибраторов, а также путем внешней калибровки во время регулярного технического обслуживания лаборатории.
- Откалибруйте весы путем взвешивания внешних эталонных гирь (например, 1, 2, 5 и 10 г, чтобы охватить весовой диапазон образцов эякулята).
- Повторите измерения 10 раз и рассчитайте среднее значение, CO и коэффициент изменчивости (КИ) ($\text{КИ} = 100 \times \text{CO} / \text{среднее значение}$).
- Проверьте точность. Находится ли заданный вес в пределах 2 CO от среднего измеренного значения?



8.6.5.2 Пипетки

- Калибровка пипеток осуществляется путем аспирации очищенной воды до отметки градуированной шкалы и ее выливания в лодочки для взвешивания, помещенные на предварительно обнуленные аналитические весы.
- Рассчитайте предполагаемый объем по весу воды, набранной в пипетку, исходя из плотности 1 г/мл.



Примечание. При возрастании температуры плотность воды уменьшается (437). Она составляет 0,9982 г/мл при 20°C, 0,9956 г/мл при 30°C и 0,9922 г/мл при 40°C. Но для целей калибровки достаточно принять значение 1,0 г/мл.

- Повторите измерения 10 раз и рассчитайте среднее значение, СО и КИ (= 100 × СО/среднее значение).
- Проверьте точность. Находится ли заданный объем в пределах 2 СО от среднего измеренного значения?

8.6.5.3 Глубина камер

- Измерьте глубину счетных камер с помощью шкалы Верньера, используя тонкую фокусировку микроскопа. Сфокусируйтесь сначала на сетке камеры, а затем на чернильной метке на нижней стороне покровного стекла. Измерьте число делений между этими двумя точками.
- Повторите измерения 10 раз и рассчитайте среднее значение, СО и КИ (= 100 × СО/среднее значение).
- Проверьте точность. Находится ли заданная глубина в пределах 2 СО от среднего измеренного значения?

8.6.5.4 Инкубаторы

- Температура инкубаторов и подогреваемых предметных столиков должна проверяться с помощью термометров, которые, в свою очередь, регулярно калибруются.
- Газовые смеси CO₂ следует проверять ежедневно по показаниям инкубатора или с помощью других систем газоанализаторов на еженедельной или ежемесячной основе, а также путем отбора проб газа во время технического обслуживания.

8.6.5.5 Индикаторная бумага для определения pH

Ее следует откалибровать по известным стандартам pH.

8.6.5.6 Другое оборудование

Другое лабораторное оборудование и реактивы, например pH-метры, также следует проверять на соответствие стандартам каждые 3–6 месяцев.



8.7 Национальные программы внешнего контроля качества исследований эякулята

Ряд научных обществ и организаций в области андрологии в разных странах оказывают содействие в создании и поддержании действующих программ ВнКК исследований эякулята, и к ним можно обратиться для получения дополнительной информации. Поддержка оказывается на различных уровнях. Некоторые организации предлагают формализованные программы в сотрудничестве с ассоциированными компаниями. Эти программы организуют обучение и предоставляют материалы, необходимые для выполнения правовых требований, существующих в разных странах. Обычно эти курсы и программы аккредитованы в соответствующих странах и регионах. Другие организации предлагают обучение по конкретным аспектам исследований эякулята или практическое ознакомление с конкретными процедурами. Всемирная организация здравоохранения не связана ни с одной из этих программ.



Глава 9. Справочная литература

1. Belsey M, Eliasson R, Gallegos AJ, Moghissi KS, Paulsen CA, Prasad AMN. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Singapore: Press Concern; 1980.
2. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interactions. 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1987. 67 p.
3. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1992. 107 p.
4. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999. 128 p.
5. Campbell MJ, Lotti F, Baldi E, Schlatt S, Festin MP, Björndahl L et al. Distribution of Semen Examination Results 2020 - a follow up of data collated for the WHO semen analysis manual 2010. *Andrology*. 2021.
6. Björndahl L. What is normal semen quality? On the use and abuse of reference limits for the interpretation of semen analysis results. *Hum Fertil (Camb)*. 2011;14(3):179-86.
7. Jedrzejczak P, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Duleba AJ. Prediction of spontaneous conception based on semen parameters. *Int J Androl*. 2008;31(5):499-507.
8. Guzik DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001;345(19):1388-93.
9. Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, McLachlan R et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update*. 2017;23(6):660-80.
10. Wang C, Swerdloff RS. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1502-7.
11. Nieschlag E, Pock T, Hellenkemper B. External quality of semen analysis reveals low compliance with the WHO guidelines. *J Reproduktionsmed Endokrinol_Online*. 2017;14(6):306-10.



12. Barratt CL, Björndahl L, Menkveld R, Mortimer D. ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Hum Reprod.* 2011;26(12):3207-12.
13. Björndahl L, Kvist U. Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reprod Biomed Online.* 2003;7(4):440-8.
14. Weiske WH. Pregnancy caused by sperm from vasa efferentia. *Fertil Steril.* 1994;62(3):642-3.
15. Sobrero AJ, Macleod J. The immediate postcoital test. *Fertil Steril.* 1962;13:184-9.
16. Cooper TG, Barfield JP, Yeung CH. Changes in osmolality during liquefaction of human semen. *Int J Androl.* 2005;28(1):58-60.
17. Holmes E, Björndahl L, Kvist U. Post-ejaculatory increase in human semen osmolality in vitro. *Andrologia.* 2019:e13311.
18. Holmes E, Björndahl L, Kvist U. Possible factors influencing post-ejaculatory changes of the osmolality of human semen in vitro. *Andrologia.* 2019:e13443.
19. Zavos PM, Goodpasture JC. Clinical improvements of specific seminal deficiencies via intercourse with a seminal collection device versus masturbation. *Fertil Steril.* 1989;51(1):190-3.
20. Pound N, Javed MH, Ruberto C, Shaikh MA, Del Valle AP. Duration of sexual arousal predicts semen parameters for masturbatory ejaculates. *Physiology & behavior.* 2002;76(4-5):685-9.
21. Eliasson R. Basic semen analysis. In: Matson P, editor. *Current Topics in Andrology.* Perth: Ladybrook Publishing; 2003. p. 35-89.
22. Amann RP. Evaluating spermatogenesis using semen: the biology of emission tells why reporting total sperm per sample is important, and why reporting only number of sperm per milliliter is irrational. *J Androl.* 2009;30(6):623-5.
23. Ng KK, Donat R, Chan L, Lalak A, Di Pierro I, Handelsman DJ. Sperm output of older men. *Hum Reprod.* 2004;19(8):1811-5.
24. Cooper TG, Keck C, Oberdieck U, Nieschlag E. Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Hum Reprod.* 1993;8(8):1251-8.
25. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.* 2005;84(4):833-42.
26. Tyler JP, Crockett NG, Driscoll GL. Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation. I. Clinical characteristics. *Clin Reprod Fertil.* 1982;1(4):273-85.
27. Tyler JP, Crockett NG, Driscoll GL. Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation II. Spermatozoal vitality and storage. *Clin Reprod Fertil.* 1982;1(4):287-93.

28. De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril*. 2004;82(1):57-65.
29. Correa-Perez JR. Intrasubject abstinence and quality of sperm. *Fertil Steril*. 2005;83(5):1588-9; author reply 9-90.
30. Amann RP, Howards SS. Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. *J Urol*. 1980;124(2):211-5.
31. Amann RP. Considerations in evaluating human spermatogenesis on the basis of total sperm per ejaculate. *J Androl*. 2009;30(6):626-41.
32. Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Turtle JR. Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *Int J Androl*. 1984;7(5):369-82.
33. Behre HM, Bergmann M, Simoni M, Tuttelmann F. Primary Testicular Failure. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
34. Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E, Jorgensen N, Andersson AM, Krarup T et al. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum Reprod*. 2000;15(2):366-72.
35. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:107.
36. Santi D, Corona G. Primary and Secondary Hypogonadism. In: Simoni M, Huhtaniemi I, editors. *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction*. 2. London: Springer International Publishing; 2017. p. 687-747.
37. Medina P, Segarra G, Ballester R, Chuan P, Domenech C, Vila JM et al. Effects of antidepressants in adrenergic neurotransmission of human vas deferens. *Urology*. 2000;55(4):592-7.
38. Baker HW, Kovacs GT. Spontaneous improvement in semen quality: regression towards the mean. *Int J Androl*. 1985;8(6):421-6.
39. Alvarez C, Castilla JA, Martinez L, Ramirez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod*. 2003;18(10):2082-8.
40. Poland ML, Moghissi KS, Giblin PT, Ager JW, Olson JM. Variation of semen measures within normal men. *Fertil Steril*. 1985;44(3):396-400.
41. Berman NG, Wang C, Paulsen CA. Methodological issues in the analysis of human sperm concentration data. *J Androl*. 1996;17(1):68-73.
42. Carlsen E, Petersen JH, Andersson AM, Skakkebaek NE. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertil Steril*. 2004;82(2):358-66.
43. Castilla JA, Alvarez C, Aguilar J, Gonzalez-Varea C, Gonzalvo MC, Martinez L. Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. *Hum Reprod*. 2006;21(4):847-51.

44. Keel BA. Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil Steril.* 2006;85(1):128-34.
45. Mortimer D. *Practical Laboratory Andrology.* Oxford: Oxford University Press; 1994. 393 p.
46. Mortimer D. Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reproductive Medicine Review.* 1994;3:97-111.
47. Jones DM, Kovacs GT, Harrison L, Jennings MG, Baker HW. Immobilization of sperm by condoms and their components. *Clin Reprod Fertil.* 1986;4(6):367-72.
48. Всемирная организация здравоохранения. Практическое руководство по биологической безопасности. Третье издание, Женева, 2004 г.
49. Huggins C, Scott WW, Heinen JH. Chemical composition of human semen and of the secretions of the prostate and seminal vesicles. *Am J Physiol.* 1942;136(3):467-73.
50. Brazil C, Swan SH, Drobnis EZ, Liu F, Wang C, Redmon JB et al. Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl.* 2004;25(4):635-44.
51. Cooper TG, Brazil C, Swan SH, Overstreet JW. Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. *J Androl.* 2007;28(1):1-4.
52. Rose NR, Hjort T, Rümke P, Harper MJK, Vyazov O. Techniques for detection of iso- and auto-antibodies to human spermatozoa. *Clin Exp Immunol.* 1976;23(2):175-99.
53. Johansson E, Campana A, Luthi R, de Agostini A. Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study. *Hum Reprod Update.* 2000;6(4):404-12.
54. Freund M. Standards for the rating of human sperm morphology. A cooperative study. *Int J Fertil.* 1966;11(1):97-180.
55. Jue JS, Ramasamy R. Significance of positive semen culture in relation to male infertility and the assisted reproductive technology process. *Transl Androl Urol.* 2017;6(5):916-22.
56. Micillo A, Vassallo MR, Cordeschi G, D'Andrea S, Necozone S, Francavilla F et al. Semen leukocytes and oxidative-dependent DNA damage of spermatozoa in male partners of subfertile couples with no symptoms of genital tract infection. *Andrology.* 2016;4(5):808-15.
57. Palermo GD, Neri QV, Cozzubbo T, Cheung S, Pereira N, Rosenwaks Z. Shedding Light on the Nature of Seminal Round Cells. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151640.
58. Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl.* 1988;11(5):379-94.

59. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl.* 2000;21(1):145-53.
60. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum Reprod.* 2000;15(7):1562-7.
61. Aitken RJ, Sutton M, Warner P, Richardson DW. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *J Reprod Fertil.* 1985;73(2):441-9.
62. Mortimer D, Pandya IJ, Sawers RS. Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *J Reprod Fertil.* 1986;78(1):93-102.
63. Comhaire FH, Vermeulen L, Hinting A, Schoonjans F. Accuracy of sperm characteristics in predicting the in vitro fertilizing capacity of semen. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1988;5(6):326-31.
64. Barratt CL, McLeod ID, Dunphy BC, Cooke ID. Prognostic value of two putative sperm function tests: hypo-osmotic swelling and bovine sperm mucus penetration test (Penetrak). *Hum Reprod.* 1992;7(9):1240-4.
65. Irvine DS, Aitken RJ. Predictive value of in-vitro sperm function tests in the context of an AID service. *Hum Reprod.* 1986;1(8):539-45.
66. Bollendorf A, Check JH, Lurie D. Evaluation of the effect of the absence of sperm with rapid and linear progressive motility on subsequent pregnancy rates following intrauterine insemination or in vitro fertilization. *J Androl.* 1996;17(5):550-7.
67. Sifer C, Sasportes T, Barraud V, Poncelet C, Rudant J, Porcher R et al. World Health Organization grade 'a' motility and zona-binding test accurately predict IVF outcome for mild male factor and unexplained infertilities. *Hum Reprod.* 2005;20(10):2769-75.
68. Van den Bergh M, Emiliani S, Biramane J, Vannin AS, Englert Y. A first prospective study of the individual straight line velocity of the spermatozoon and its influences on the fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998;13(11):3103-7.
69. Björndahl L. The usefulness and significance of assessing rapidly progressive spermatozoa. *Asian J Androl.* 2010;12(1):33-5.
70. Eliasson R. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. *Asian J Androl.* 2010;12(1):26-32.
71. Afzelius BA, Eliasson R, Johnsen O, Lindholmer C. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J Cell Biol.* 1975;66(2):225-32.
72. Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update.* 2003;9(5):405-28.

73. Wilton LJ, Temple-Smith PD, Baker HW, de Kretser DM. Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis. *Fertil Steril.* 1988;49(6):1052-8.
74. Correa-Perez JR, Fernandez-Pelegrina R, Aslanis P, Zavos PM. Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necropermia. *Fertil Steril.* 2004;81(4):1148-50.
75. Björndahl L, Soderlund I, Johansson S, Mohammadieh M, Pourian MR, Kvist U. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *J Androl.* 2004;25(5):671-8.
76. Björndahl L, Soderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod.* 2003;18(4):813-6.
77. Mortimer D. A technical note on the assessment of human sperm vitality using eosin-nigrosin staining. *Reprod Biomed Online.* 2020;40(6):851-5.
78. Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod.* 2002;17(2):503-15.
79. World Health Organization. Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility: Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertil Steril.* 1996;65(4):821-9.
80. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet.* 1998;352(9135):1172-7.
81. Behre HM, Yeung CH, Holstein AF, Weinbauer GF, Gassner C, Nieschlag E. Diagnosis of Male Infertility and Hypogonadism. In: Nieschlag E, Behre HM, editors. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction.* second ed. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag; 2000. p. 90-121.
82. MacLeod J, Wang Y. Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. *Fertil Steril.* 1979;31(2):103-16.
83. Eliasson R. Analysis of semen. In: Behrman SJ, Kistner RW, editors. *Progress in Infertility.* Boston: Little, Brown and Co; 1975. p. 691-713.
84. Björndahl L, Mortimer D, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U et al. *A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology.* Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
85. Mortimer D, Shu MA, Tan R. Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Human reproduction (Oxford, England).* 1986;1(5):299-303.
86. Kirkman-Brown J, Björndahl L. Evaluation of a disposable plastic Neubauer counting chamber for semen analysis. *Fertil Steril.* 2009;91(2):627-31.

87. Cooper TG, Hellenkemper B, Jonckheere J, Callewaert N, Grootenhuis AJ, Kersemaekers WM et al. Azoospermia: virtual reality or possible to quantify? *J Androl.* 2006;27(4):483-90.
88. Ezeh UI, Moore HM. Redefining azoospermia and its implications. *Fertil Steril.* 2001;75(1):213-4.
89. Sharif K. Reclassification of azoospermia: the time has come? *Hum Reprod.* 2000;15(2):237-8.
90. Eliasson R. Analysis of semen. In: Burger HG, De Kretser DM, editors. *The Testis.* New York: Raven Press; 1981. p. 381-99.
91. Lindsay KS, Floyd I, Swan R. Classification of azoospermic samples. *Lancet.* 1995;345(8965):1642.
92. Jaffe TM, Kim ED, Hoekstra TH, Lipshultz LI. Sperm pellet analysis: a technique to detect the presence of sperm in men considered to have azoospermia by routine semen analysis. *J Urol.* 1998;159(5):1548-50.
93. Corea M, Campagnone J, Sigman M. The diagnosis of azoospermia depends on the force of centrifugation. *Fertil Steril.* 2005;83(4):920-2.
94. Fredricsson B, Bjork G. Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertil Steril.* 1977;28(8):841-5.
95. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod.* 1990;5(5):586-92.
96. Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD. Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev.* 1991;30(4):346-52.
97. Liu DY, Baker HW. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *J Reprod Fertil.* 1992;94(1):71-84.
98. Eggert-Kruse W, Schwarz H, Rohr G, Demirakca T, Tilgen W, Runnebaum B. Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. *Hum Reprod.* 1996;11(1):139-46.
99. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update.* 1998;4(1):73-82.
100. Toner JP, Mossad H, Grow DR, Morshedi M, Swanson RJ, Oehninger S. Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination. *Andrologia.* 1995;27(3):143-8.
101. Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update.* 2001;7(5):495-500.
102. Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Rushford DD, Baker HW. Automated semen analysis: 'zona pellucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Hum Reprod.* 2003;18(8):1643-9.

103. Liu DY, Garrett C, Baker HW. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Hum Reprod.* 2003;18(11):2382-9.
104. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM et al. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod.* 2001;16(6):1165-71.
105. van der Merwe FH, Kruger TF, Oehninger SC, Lombard CJ. The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecol Obstet Invest.* 2005;59(2):86-91.
106. Mortimer D. The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *Mol Hum Reprod.* 2018;24(12):567-92.
107. Katz DF, Overstreet JW, Samuels SJ, Niswander PW, Bloom TD, Lewis EL. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *J Androl.* 1986;7(4):203-10.
108. Abraham-Peskir JV, Chantler E, Uggerhoj E, Fedder J. Response of midpiece vesicles on human sperm to osmotic stress. *Hum Reprod.* 2002;17(2):375-82.
109. Cooper TG, Yeung CH, Fetic S, Sobhani A, Nieschlag E. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. *Hum Reprod.* 2004;19(10):2283-8.
110. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1988;49(1):112-7.
111. Zollner U, Schleyer M, Steck T. Evaluation of a cut-off value for normal sperm morphology using strict criteria to predict fertilization after conventional in-vitro fertilization and embryo transfer in asthenozoospermia. *Hum Reprod.* 1996;11(10):2155-61.
112. Franken DR, Barendsen R, Kruger TF. A continuous quality control program for strict sperm morphology. *Fertil Steril.* 2000;74(4):721-4.
113. Menkveld R, El-Garem Y, Schill WB, Henkel R. Relationship between human sperm morphology and acrosomal function. *J Assist Reprod Genet.* 2003;20(10):432-8.
114. Kvist U, Björndahl L. *Manual on Basic Semen Analysis 2002.* Heineman MJ, editor. Oxford: Oxford Academic; 2002 2002-06-15. 24 p.
115. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1986;46(6):1118-23.
116. Inaba K, Mizuno K. Sperm dysfunction and ciliopathy. *Reprod Med Biol.* 2016;15(2):77-94.
117. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000;15(4):830-9.

118. Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod.* 1996;11(9):1942-6.
119. Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia.* 1988;20(3):211-7.
120. Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis C, Bergues U, Hennebicq S et al. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod.* 2002;17(5):1292-8.
121. Martin RH, Rademaker AW, Greene C, Ko E, Hoang T, Barclay L et al. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biol Reprod.* 2003;69(2):535-9.
122. Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment--historical perspectives and current opinions. *J Androl.* 2001;22(2):192-205.
123. Chantler E, Abraham-Peskir JV. Significance of midpiece vesicles and functional integrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress. *Andrologia.* 2004;36(2):87-93.
124. Fetic S, Yeung CH, Sonntag B, Nieschlag E, Cooper TG. Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. *J Androl.* 2006;27(2):294-301.
125. Pelfrey RJ, Overstreet JW, Lewis EL. Abnormalities of sperm morphology in cases of persistent infertility after vasectomy reversal. *Fertil Steril.* 1982;38(1):112-4.
126. Rothmann SA, Bort AM, Quigley J, Pillow R. Sperm morphology classification: a rational method for schemes adopted by the world health organization. *Methods Mol Biol.* 2013;927:27-37.
127. Iwamoto T, Nozawa S, Yoshiike M, Hoshino T, Baba K, Matsushita T et al. Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Hum Reprod.* 2006;21(3):760-5.
128. de la Taille A, Rigot JM, Mahe P, Gervais R, Dumur V, Lemaitre L et al. [Correlation of genitourinary abnormalities, spermiogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens]. *Prog Urol.* 1998;8(3):370-6.
129. Weiske WH, Salzler N, Schroeder-Printzen I, Weidner W. Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia. *Andrologia.* 2000;32(1):13-8.
130. Daudin M, Bieth E, Bujan L, Massat G, Pontonnier F, Mieuxset R. Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertil Steril.* 2000;74(6):1164-74.
131. von Eckardstein S, Cooper TG, Rutscha K, Meschede D, Horst J, Nieschlag E. Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2000;73(6):1226-31.

132. Kussler AP, Pimentel AM, Alcoba DD, Liu IP, Brum IS, Capp E et al. Mechanical processing of hyperviscous semen specimens can negatively affect sperm DNA fragmentation. *Int Urol Nephrol.* 2014;46(4):737-42.
133. de la Taille A, Rigot JM, Mahe P, Vankemmel O, Gervais R, Dumur V et al. Correlation between genito-urinary anomalies, semen analysis and CFTR genotype in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Br J Urol.* 1998;81(4):614-9.
134. Haugen TB, Grotmol T. pH of human semen. *Int J Androl.* 1998;21(2):105-8.
135. Le Lannou D, Griveau JF, Le Pichon JP, Quero JC. Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Hum Reprod.* 1992;7(10):1417-21.
136. Kraemer M, Fillion C, Martin-Pont B, Auger J. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Hum Reprod.* 1998;13(3):611-9.
137. Motulsky H. *Intuitive biostatistics.* New York: Oxford University Press; 1995.
138. Seaman EK, Goluboff E, BarChama N, Fisch H. Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads. *Fertil Steril.* 1996;66(4):662-5.
139. Mahmoud AM, Depoorter B, Piens N, Comhaire FH. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertil Steril.* 1997;68(2):340-5.
140. Björndahl L, Magnusson K, Holmberg R. Validation of Cellvision Disposable 100 Micrometer Hemocytometer With Improved Neubauer Ruling. *Andrology.* 2018;6(S1).
141. Brazil C, Swan SH, Tollner CR, Treece C, Drobnis EZ, Wang C et al. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl.* 2004;25(4):645-56.
142. Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Althouse GC. Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *J Androl.* 2005;26(1):115-22.
143. Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Althouse GC. Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *J Androl.* 2005;26(1):107-14.
144. Björndahl L, Barratt CL. Semen analysis: setting standards for the measurement of sperm numbers. *J Androl.* 2005;26(1):11.
145. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 1984;70(1):219-28.

146. Hossain AM, Rizk B, Barik S, Huff C, Thorneycroft IH. Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Hum Reprod.* 1998;13(6):1578-83.
147. Holmes E. On osmolality and sperm function during processing for assisted reproduction [Academic]. Stockholm, Sweden: Karolinska Institutet; 2020.
148. Meschede D, Keck C, Zander M, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis. *Int J Androl.* 1993;16(6):362-9.
149. Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl.* 1987;18(3):275-7.
150. Coetzee K, Kruger TF, Vandendael A, de Villiers A, Lombard CJ. Comparison of two staining and evaluation methods used for computerized human sperm morphology evaluations. *Andrologia.* 1997;29(3):133-5.
151. Oral E, Yetis O, Elibol F, Senol H, Irez T, Aksu FM. Assessment of human sperm morphology by strict criteria: comparison of wet preparation versus stained with the modified Diff-Quik method. *Arch Androl.* 2002;48(4):307-14.
152. Maree L, du Plessis SS, Menkveld R, van der Horst G. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Hum Reprod.* 2010;25(6):1369-82.
153. Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensen N, Skakkebaek NE et al. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod.* 2001;16(12):2710-7.
154. Menkveld RK, T.F. Basic Semen Analysis. In: Acosta AA, editor. Human spermatozoa in assisted reproduction. Baltimore: Williams & Wilkins; 1990. p. 68-84.
155. Aziz N, Buchan I, Taylor C, Kingsland CR, Lewis-Jones I. The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. *Fertil Steril.* 1996;66(6):1000-8.
156. Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ, Jr. Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril.* 2004;82(3):621-7.
157. Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ, Jr. et al. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril.* 2004;81(2):349-54.
158. David G, Czyglik F, Mayaux MJ, Schwartz D. The success of A.I.D. and semen characteristics: study on 1489 cycles and 192 ejaculates. *Int J Androl.* 1980;3(6):613-9.
159. Auger JE, F. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologia.* 2000;10:358-73.

160. ESHRE/NAFA. Manual on basic semen analysis (ESHRE Monographs #2). Oxford: Oxford University Press; 2002.
161. Wang WL, Tu CF, Tan YQ. Insight on multiple morphological abnormalities of sperm flagella in male infertility: what is new? *Asian J Androl.* 2020;22(3):236-45.
162. Coutton C, Escoffier J, Martinez G, Arnoult C, Ray PF. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update.* 2015;21(4):455-85.
163. Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod.* 2001;16(5):1012-9.
164. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Cambi M, Lotti F, Natali I et al. DNA fragmentation in brighter sperm predicts male fertility independently from age and semen parameters. *Fertil Steril.* 2015;104(3):582-90 e4.
165. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Baldi E. Sperm DNA Fragmentation: Mechanisms of Origin. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1166:75-85.
166. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.* 2010;93(4):1027-36.
167. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2012;27(10):2908-17.
168. Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, Bruin JP, Mol BW et al. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165125.
169. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl.* 2017;19(1):80-90.
170. Tan J, Taskin O, Albert A, Bedaiwy MA. Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2019;38(6):951-60.
171. Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil.* 2014;15(1):2-14.
172. Robbins DJ, Coleman MS. Initiator role of double stranded DNA in terminal transferase catalyzed polymerization reactions. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(7):2943-57.
173. Sharma R, Masaki J, Agarwal A. Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. *Methods Mol Biol.* 2013;927:121-36.
174. Muratori M, Tamburrino L, Tocci V, Costantino A, Marchiani S, Giachini C et al. Small variations in crucial steps of TUNEL assay coupled to flow cytometry greatly affect measures of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 2010;31(4):336-45.

175. Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Guido C, Forti G, Baldi E. Critical aspects of detection of sperm DNA fragmentation by TUNEL/flow cytometry. *Syst Biol Reprod Med*. 2010;56(4):277-85.
176. Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*. 2008;44(3):250-4.
177. Dominguez-Fandos D, Camejo MI, Balleca JL, Oliva R. Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A*. 2007;71(12):1011-8.
178. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod*. 2005;20(12):3446-51.
179. Sergerie M, Laforest G, Boulanger K, Bissonnette F, Bleau G. Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labelling assay. *Hum Reprod*. 2005;20(7):1921-7.
180. Antonucci N, Manes S, Corradetti B, Manicardi GC, Borini A, Bizzaro D. A novel in vitro sperm head decondensation protocol for rapid flow cytometric measurement of deoxyribonucleic acid content. *Fertil Steril*. 2013;99(7):1857-61.
181. Mitchell LA, De luliis GN, Aitken RJ. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *Int J Androl*. 2011;34(1):2-13.
182. Ribeiro SC, Muratori M, De Geyter M, De Geyter C. TUNEL labeling with BrdUTP/anti-BrdUTP greatly underestimates the level of sperm DNA fragmentation in semen evaluation. *PLoS One*. 2017;12(8):e0181802.
183. Muratori M, Pellegrino G, Mangone G, Azzari C, Lotti F, Tarozzi N et al. DNA Fragmentation in Viable and Non-Viable Spermatozoa Discriminates Fertile and Subfertile Subjects with Similar Accuracy. *J Clin Med*. 2020;9(5).
184. Martinez MG, Sanchez-Martin P, Dorado-Silva M, Fernandez JL, Girones E, Johnston SD et al. Magnetic-activated cell sorting is not completely effective at reducing sperm DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(12):2215-21.
185. Fernandez JL, Cajigal D, Lopez-Fernandez C, Gosalvez J. Assessing sperm DNA fragmentation with the sperm chromatin dispersion test. *Methods Mol Biol*. 2011;682:291-301.
186. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003;24(1):59-66.
187. Gosalvez J, Rodriguez-Predreira M, Mosquera A, Lopez-Fernandez C, Esteves SC, Agarwal A et al. Characterisation of a subpopulation of sperm with massive nuclear damage, as recognised with the sperm chromatin dispersion test. *Andrologia*. 2014;46(6):602-9.
188. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res*. 1996;363(2):89-96.

189. McKelvey-Martin VJ, Melia N, Walsh IK, Johnston SR, Hughes CM, Lewis SE et al. Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2). Human sperm and male infertility. *Mutat Res.* 1997;375(2):93-104.
190. Simon L, Carrell DT. Sperm DNA damage measured by comet assay. *Methods Mol Biol.* 2013;927:137-46.
191. Baumgartner A, Cemeli E, Anderson D. The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell Biol Toxicol.* 2009;25(1):81-98.
192. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res.* 1997;375(2):183-93.
193. Konca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gozdz S et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat Res.* 2003;534(1-2):15-20.
194. Gonzalez JE, Romero I, Barquinero JF, Garcia O. Automatic analysis of silver-stained comets by CellProfiler software. *Mutat Res.* 2012;748(1-2):60-4.
195. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online.* 2011;23(6):724-34.
196. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology.* 2013;1(5):715-22.
197. Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Corrigendum to "Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility". *Clin Exp Reprod Med.* 2019;46(4):211.
198. Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clin Exp Reprod Med.* 2019;46(1):14-21.
199. Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA(R)). *Methods Mol Biol.* 2013;927:147-64.
200. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci.* 2000;22(2-3):169-89.
201. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay for fertility assessment. *Curr Protoc Cytom.* 2001;Chapter 7:Unit 7 13.
202. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999;14(4):1039-49.
203. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl.* 2010;33(1):e221-7.

204. Godo A, Blanco J, Vidal F, Sandalinas M, Garcia-Guixe E, Anton E. Altered segregation pattern and numerical chromosome abnormalities interrelate in spermatozoa from Robertsonian translocation carriers. *Reprod Biomed Online*. 2015;31(1):79-88.
205. Wang BN, B.; Tang, D.; Li, R.; Liu, X.; Song, J.; Wang, W.; Liu, Z. . Analysis of Meiotic Segregation Patterns and Interchromosomal Effects in Sperm from 13 Robertsonian Translocations. *Balkan J Med Genet* 2017;20(1):43-50.
206. Enciso M, Alfarawati S, Wells D. Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum Reprod*. 2013;28(6):1707-15.
207. Ramasamy R, Scovell JM, Kovac JR, Cook PJ, Lamb DJ, Lipshultz LI. Fluorescence in situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2015;103(4):906-9 e1.
208. Kohn TP, Kohn JR, Darilek S, Ramasamy R, Lipshultz L. Genetic counseling for men with recurrent pregnancy loss or recurrent implantation failure due to abnormal sperm chromosomal aneuploidy. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(5):571-6.
209. Ramasamy R, Besada S, Lamb DJ. Fluorescent in situ hybridization of human sperm: diagnostics, indications, and therapeutic implications. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1534-9.
210. Ryu HM, Lin WW, Lamb DJ, Chuang W, Lipshultz LI, Bischoff FZ. Increased chromosome X, Y, and 18 nondisjunction in sperm from infertile patients that were identified as normal by strict morphology: implication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2001;76(5):879-83.
211. Ioannou D, Fortun J, Tempest HG. Meiotic nondisjunction and sperm aneuploidy in humans. *Reproduction*. 2019;157(1):R15-R31.
212. Neusser M, Rogenhofer N, Durl S, Ochsenkuhn R, Trottmann M, Jurinovic V et al. Increased chromosome 16 disomy rates in human spermatozoa and recurrent spontaneous abortions. *Fertil Steril*. 2015;104(5):1130-7 e1-10.
213. Templado C, Uroz L, Estop A. New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 2013;19(10):634-43.
214. Tomlinson MJ, Barratt CL, Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril*. 1993;60(6):1069-75.
215. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril*. 1995;63(6):1143-57.
216. Homyk M, Anderson DJ, Wolff H, Herr JC. Differential diagnosis of immature germ cells in semen utilizing monoclonal antibody MHS-10 to the intra-acrosomal antigen SP-10. *Fertil Steril*. 1990;53(2):323-30.
217. Nahoum CR, Cardozo D. Staining for volumetric count of leukocytes in semen and prostrate-vesicular fluid. *Fertil Steril*. 1980;34(1):68-9.

218. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl.* 2001;22(4):575-83.
219. Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R. The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia.* 2003;35(5):271-8.
220. Aitken RJ, Baker HW. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Hum Reprod.* 1995;10(7):1736-9.
221. Rossi AG, Aitken RJ. Interactions between leukocytes and the male reproductive system. The unanswered questions. *Adv Exp Med Biol.* 1997;424:245-52.
222. Couture M, Ulstein M, Leonard J, Paulsen CA. Improved staining method for differentiating immature germ cells from white blood cells in human seminal fluid. *Andrologia.* 1976;8(1):61-6.
223. Ezeh UI, Martin M, Cooke ID, Moore HD. Correlation of testicular pathology and sperm extraction in azoospermic men with ejaculated spermatids detected by immunofluorescent localization. *Hum Reprod.* 1998;13(11):3061-5.
224. Barbonetti A, Castellini C, D'Andrea S, Cordeschi G, Santucci R, Francavilla S et al. Prevalence of anti-sperm antibodies and relationship of degree of sperm auto-immunization to semen parameters and post-coital test outcome: a retrospective analysis of over 10 000 men. *Hum Reprod.* 2019;34(5):834-41.
225. Kremer J, Jager S. Characteristics of anti-spermatozoal antibodies responsible for the shaking phenomenon with special regard to immunoglobulin class and antigen-reactive sites. *Int J Androl.* 1980;3(2):143-52.
226. Bronson R, Cooper G, Rosenfeld D. Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertil Steril.* 1984;42(2):171-83.
227. Bronson R, Cooper G, Rosenfeld D, Witkin SS. Detection of spontaneously occurring sperm-directed antibodies in infertile couples by immunobead binding and enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann N Y Acad Sci.* 1984;438:504-7.
228. Bronson RA. Detection of sperm specific antibodies on the spermatozoa surface by immunobead binding. *Arch Androl.* 1982;9:61.
229. Clarke GN. Immunoglobulin class of sperm-bound antibodies in semen. . In: Bratanov K, editor. *Immunology of Reproduction.* Bulgarian: Bulgarian Academy of Sciences Press; 1982. p. 462-85.
230. Hellstrom WJ, Samuels SJ, Waits AB, Overstreet JW. A comparison of the usefulness of SpermMar and immunobead tests for the detection of antisperm antibodies. *Fertil Steril.* 1989;52(6):1027-31.
231. Scarselli G, Livi C, Chelo E, Dubini V, Pellegrini S. Approach to immunological male infertility: a comparison between MAR test and direct immunobead test. *Acta Eur Fertil.* 1987;18(1):55-7.
232. MacMillan RA, Baker HW. Comparison of latex and polyacrylamide beads for detecting sperm antibodies. *Clin Reprod Fertil.* 1987;5(4):203-9.

233. Meinertz H, Bronson R. Detection of antisperm antibodies on the surface of motile spermatozoa. Comparison of the immunobead binding technique (IBT) and the mixed antiglobulin reaction (MAR). *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1988;18(4):120-3.
234. Abshagen K, Behre HM, Cooper TG, Nieschlag E. Influence of sperm surface antibodies on spontaneous pregnancy rates. *Fertil Steril.* 1998;70(2):355-6.
235. Chiu WW, Chamley LW. Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies. *Fertil Steril.* 2004;82(3):529-35.
236. Rajah SV, Parslow JM, Howell RJ, Hendry WF. Comparison of mixed antiglobulin reaction and direct immunobead test for detection of sperm-bound antibodies in subfertile males. *Fertil Steril.* 1992;57(6):1300-3.
237. Gould JE, Brazil CK, Overstreet JW. Sperm-immunobead binding decreases with in vitro incubation. *Fertil Steril.* 1994;62(1):167-71.
238. Barratt CL, Dunphy BC, McLeod I, Cooke ID. The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies. *Hum Reprod.* 1992;7(1):95-8.
239. von der Kammer H, Scheit KH, Weidner W, Cooper TG. The evaluation of markers of prostatic function. *Urol Res.* 1991;19(6):343-7.
240. Cooper TG, Weidner W, Nieschlag E. The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers alpha-glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *Int J Androl.* 1990;13(5):329-36.
241. Moellering H, Gruber W. Determination of citrate with citrate lyase. *Anal Biochem.* 1966;17(3):369-76.
242. Heite HJ, Wetterauer W. [Acid phosphatase in seminal fluid--method of estimation and diagnostic significance]. *Andrologia.* 1979;11(2):113-22.
243. Wang J, Niu Y, Zhang C, Chen Y. A micro-plate colorimetric assay for rapid determination of trace zinc in animal feed, pet food and drinking water by ion masking and statistical partitioning correction. *Food Chem.* 2018;245:337-45.
244. Johnsen O, Eliasson R. Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc in human seminal plasma. *Int J Androl.* 1987;10(2):435-40.
245. Cooper TG, Jockenhovel F, Nieschlag E. Variations in semen parameters from fathers. *Hum Reprod.* 1991;6(6):859-66.
246. Björndahl L. Prevalence of high zinc concentrations in 45,000 ejaculates - Unpublished data. 2021.
247. Karvonen MJ, Malm M. Colorimetric determination of fructose with indol. *Scand J Clin Lab Invest.* 1955;7(4):305-7.

248. Paquin R, Chapdelaine P, Dube JY, Tremblay RR. Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal alpha-1,4-glucosidase. *J Androl.* 1984;5(4):277-82.
249. Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, Jockenhovel F, Nieschlag E. Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of alpha-glucosidase in seminal plasma. *Int J Androl.* 1990;13(4):297-305.
250. Björndahl L, Magnusson K, Larsson Chatziantonis M, Holmberg R, Flanagan J. When is a vasectomy successful? Laboratory aspects. *Andrology.* 2019;7, Suppl 1:96-97.
251. MacLeod J, Hotchkiss RS. The Distribution of Spermatozoa and of Certain Chemical Constituents in the Human Ejaculate. *J Urol.* 1942;48(2):225-9.
252. MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. III. An analysis of motile activity in the spermatozoa of 1000 fertile men and 1000 men in infertile marriage. *Fertil Steril.* 1951;2(3):187-204.
253. Björndahl L, Kvist U. Influence of seminal vesicular fluid on the zinc content of human sperm chromatin. *Int J Androl.* 1990;13(3):232-7.
254. Kvist U, Kjellberg S, Björndahl L, Soufir JC, Arver S. Seminal fluid from men with agenesis of the Wolffian ducts: zinc-binding properties and effects on sperm chromatin stability. *Int J Androl.* 1990;13(4):245-52.
255. Björndahl L, Kjellberg S, Kvist U. Ejaculatory sequence in men with low sperm chromatin-zinc. *Int J Androl.* 1991;14(3):174-8.
256. Lindholmer C. Survival of human spermatozoa in different fractions of split ejaculate. *Fertil Steril.* 1973;24(7):521-6.
257. Lundquist F. Aspects of the biochemistry of human semen. . *Acta Physiol Scand.* 1949;19, Suppl 66:1-108.
258. Beiswanger JC, Deaton JL, Jarow JP. Partial ejaculatory duct obstruction causing early demise of sperm. *Urology.* 1998;51(1):125-7.
259. Eisenberg ML, Walsh TJ, Garcia MM, Shinohara K, Turek PJ. Ejaculatory duct manometry in normal men and in patients with ejaculatory duct obstruction. *J Urol.* 2008;180(1):255-60; discussion 60.
260. Fisch H, Kang YM, Johnson CW, Goluboff ET. Ejaculatory duct obstruction. *Curr Opin Urol.* 2002;12(6):509-15.
261. Lotti F, Corona G, Cocci A, Cipriani S, Baldi E, Degl'Innocenti S et al. The prevalence of midline prostatic cysts and the relationship between cyst size and semen parameters among infertile and fertile men. *Hum Reprod.* 2018;33(11):2023-34.
262. Nagler HM, Rotman M, Zoltan E, Fisch H. The natural history of partial ejaculatory duct obstruction. *J Urol.* 2002;167(1):253-4.
263. Onur MR, Orhan I, Firdolas F, Onur R, Kocakoc E. Clinical and radiological evaluation of ejaculatory duct obstruction. *Arch Androl.* 2007;53(4):179-86.

264. Smith JF, Walsh TJ, Turek PJ. Ejaculatory duct obstruction. *Urol Clin North Am.* 2008;35(2):221-7, viii.
265. Turek PJ, Magana JO, Lipshultz LI. Semen parameters before and after transurethral surgery for ejaculatory duct obstruction. *J Urol.* 1996;155(4):1291-3.
266. Avellino GJ, Lipshultz LI, Sigman M, Hwang K. Transurethral resection of the ejaculatory ducts: etiology of obstruction and surgical treatment options. *Fertil Steril.* 2019;111(3):427-43.
267. Chan PTK, Aube M. Infertility due to ejaculatory duct obstruction can be surgically corrected—a forgotten lesson in male reproductive urology. *Fertil Steril.* 2018;110(7):1275-6.
268. El-Assmy A, El-Tholoth H, Abouelkheir RT, Abou-El-Ghar ME. Transurethral resection of ejaculatory duct in infertile men: outcome and predictors of success. *Int Urol Nephrol.* 2012;44(6):1623-30.
269. Halpern JA, Brannigan RE, Schlegel PN. Fertility-enhancing male reproductive surgery: glimpses into the past and thoughts for the future. *Fertil Steril.* 2019;112(3):426-37.
270. Kadioglu A, Cayan S, Tefekli A, Orhan I, Engin G, Turek PJ. Does response to treatment of ejaculatory duct obstruction in infertile men vary with pathology? *Fertil Steril.* 2001;76(1):138-42.
271. McQuaid JW, Tanrikut C. Ejaculatory duct obstruction: current diagnosis and treatment. *Curr Urol Rep.* 2013;14(4):291-7.
272. Fisch H, Lambert SM, Goluboff ET. Management of ejaculatory duct obstruction: etiology, diagnosis, and treatment. *World J Urol.* 2006;24(6):604-10.
273. Mortimer D, Björndahl L, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U et al. A practical guide to basic laboratory andrology. 1st ed. Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press; In Press.
274. Amelar RD, Hotchkiss RS. The Split Ejaculate: Its Use in the Management of Male Infertility. *Fertil Steril.* 1965;16:46-60.
275. Eisenberg ML, Li S, Behr B, Pera RR, Cullen MR. Relationship between semen production and medical comorbidity. *Fertil Steril.* 2015;103(1):66-71.
276. Selvaraju V, Baskaran S, Agarwal A, Henkel R. Environmental contaminants and male infertility: Effects and mechanisms. *Andrologia.* 2020:e13646.
277. Levine H, Jorgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update.* 2017;23(6):646-59.
278. Muratori M, De Geyter C. Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2019;33(1):117-26.

279. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril.* 1979;31(5):531-7.
280. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl.* 1987;8(5):338-48.
281. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1987;81(2):459-69.
282. Bisht S, Dada R. Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Front Biosci (Schol Ed).* 2017;9:420-47.
283. O'Flaherty C, Matsushita-Fournier D. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. *Biol Reprod.* 2017;97(4):577-85.
284. Aitken RJ. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction.* 2020;159(4):R189-R201.
285. Dias TR. Measurement of Reactive Oxygen Species in Semen Samples Using Chemiluminescence. *Methods Mol Biol.* 2021;2202:103-9.
286. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ. A new method for measuring antioxidant activity. *Biochem Soc Trans.* 1993;21(2):95S.
287. Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS+ radical cation assay. *Free Radic Res.* 1997;26(3):195-9.
288. Xu F, Guo G, Zhu W, Fan L. Human sperm acrosome function assays are predictive of fertilization rate in vitro: a retrospective cohort study and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):81.
289. Franken DR, Bastiaan HS, Oehninger SC. Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *J Assist Reprod Genet.* 2000;17(3):156-61.
290. Tamburrino L, Marchiani S, Muratori M, Luconi M, Baldi E. Progesterone, spermatozoa and reproduction: An updated review. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;516:110952.
291. Liu DY, Baker HW. Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding. *Fertil Steril.* 1996;66(2):312-5.
292. Fierro R, Foliguet B, Grignon G, Daniel M, Bene MC, Faure GC et al. Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Arch Androl.* 1996;36(3):187-96.

293. Cross N. Methods for evaluating the acrosomal status of human sperm. In: Fenichel P, Parinaud J, editors. Human sperm acrosome reaction. Colloques INSERM. Paris: John Libbey Eurotext; 1995. p. 277-85.
294. Aitken RJ, Buckingham DW, Fang HG. Analysis of the responses of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *J Androl.* 1993;14(2):132-41.
295. Jin SK, Yang WX. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget.* 2017;8(2):3600-27.
296. Cross N. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research.* 1986;15 213-26.
297. Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J Reprod Fertil.* 1987;81(1):127-35.
298. Pember S, Jequier A, Yovich J. A Test of the Human Sperm Acrosome Reaction Following Ionophore Challenge Relationship to Fertility and Other Seminal Parameters. *Journal of andrology.* 1991;12:98-103.
299. Krausz C, Bonaccorsi L, Maggio P, Luconi M, Criscuoli L, Fuzzi B et al. Two functional assays of sperm responsiveness to progesterone and their predictive values in in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1996;11(8):1661-7.
300. Björndahl L, Kvist U. A model for the importance of zinc in the dynamics of human sperm chromatin stabilization after ejaculation in relation to sperm DNA vulnerability. *Syst Biol Reprod Med.* 2011;57(1-2):86-92.
301. Colaco S, Sakkas D. Paternal factors contributing to embryo quality. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(11):1953-68.
302. Marchiani S, Tamburrino L, Benini F, Fanfani L, Dolce R, Rastrelli G et al. Chromatin Protamination and Catsper Expression in Spermatozoa Predict Clinical Outcomes after Assisted Reproduction Programs. *Sci Rep.* 2017;7(1):15122.
303. Marchiani S, Tamburrino L, Olivito B, Betti L, Azzari C, Forti G et al. Characterization and sorting of flow cytometric populations in human semen. *Andrology.* 2014;2(3):394-401.
304. Smith JF, Syritsyna O, Fellous M, Serres C, Mannowetz N, Kirichok Y et al. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(17):6823-8.
305. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature.* 2001;413(6856):603-9.
306. Brown SG, Publicover SJ, Barratt CLR, Martins da Silva SJ. Human sperm ion channel (dys)function: implications for fertilization. *Hum Reprod Update.* 2019;25(6):758-76.

307. Luo T, Chen HY, Zou QX, Wang T, Cheng YM, Wang HF et al. A novel copy number variation in CATSPER2 causes idiopathic male infertility with normal semen parameters. *Hum Reprod.* 2019;34(3):414-23.
308. Kelly MC, Brown SG, Costello SM, Ramalingam M, Drew E, Publicover SJ et al. Single-cell analysis of [Ca²⁺]_i signalling in sub-fertile men: characteristics and relation to fertilization outcome. *Hum Reprod.* 2018;33(6):1023-33.
309. Davis RO, Katz DF. Standardization and comparability of CASA instruments. *J Androl.* 1992;13(1):81-6.
310. Mortimer D, Mortimer S, editors. Routine application of CASA in human clinical andrology and ART laboratories. 13th International Symposium on Spermatology; 2018; Stockholm New York: Springer; 2021.
311. Mortimer D, Aitken RJ, Mortimer ST, Pacey AA. Workshop report: clinical CASA--the quest for consensus. *Reproduction, fertility, and development.* 1995;7(4):951-9.
312. ESHRE Special Interest Group in Andrology. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. 1998 Jan. Report No.: 0268-1161 (Print) Contract No.: 13.
313. Freour T, Jean M, Mirallie S, Barriere P. Computer-assisted sperm analysis parameters in young fertile sperm donors and relationship with age. *Syst Biol Reprod Med.* 2012;58(2):102-6.
314. Yuan P, Zhang Z, Luo C, Quan S, Chu Q, Zhao S. [Computer-assisted sperm analysis for assessing sperm motility parameters in in vitro fertilization]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2013;33(3):448-50.
315. Cupples G, Gallagher MT, Smith AU, Kirkman-Brown J, editors. Heads and tails. Requirements for informative and robust computational measures of sperm motility. 13th International Symposium on Spermatology; 2018; Stockholm. New York: Springer; 2021.
316. Gallagher MT, Cupples G, Ooi EH, Kirkman-Brown JC, Smith DJ. Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis. *Hum Reprod.* 2019;34(7):1173-85.
317. Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update.* 1997;3(5):403-39.
318. Zhu JJ, Pacey AA, Barratt CL, Cooke ID. Computer-assisted measurement of hyperactivation in human spermatozoa: differences between European and American versions of the Hamilton-Thorn motility analyser. *Hum Reprod.* 1994;9(3):456-62.
319. Mortimer D, Mortimer ST. Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation. *Methods Mol Biol.* 2013;927:77-87.
320. Goodson SG, White S, Stevans AM, Bhat S, Kao CY, Jaworski S et al. CASAnova: a multiclass support vector machine model for the classification of human sperm motility patterns. *Biol Reprod.* 2017;97(5):698-708.

321. Ooi EH, Smith DJ, Gadelha H, Gaffney EA, Kirkman-Brown J. The mechanics of hyperactivation in adhered human sperm. *R Soc Open Sci.* 2014;1(2):140230.
322. Garrett C, Baker HW. A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertil Steril.* 1995;63(6):1306-17.
323. Lacquet FA, Kruger TF, Du Toit TC, Lombard CJ, Sanchez Sarmiento CA, De Villiers A et al. Slide preparation and staining procedures for reliable results using computerized morphology. *Arch Androl.* 1996;36(2):133-8.
324. Menkveld R, Lacquet FA, Kruger TF, Lombard CJ, Sanchez Sarmiento CA, de Villiers A. Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised methods. *Andrologia.* 1997;29(1):1-7.
325. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia.* 1999;31(3):163-8.
326. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ, Shaughnessy D, Oehninger S, Ozgur K et al. Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. *Fertil Steril.* 1999;71(1):80-4.
327. Coetzee K, de Villiers A, Kruger TF, Lombard CJ. Clinical value of using an automated sperm morphology analyzer (IVOS). *Fertil Steril.* 1999;71(2):222-5.
328. An LM, Ma JH, Li WW, Xia XY, Huang YF, Wang WB. [Flow cytometry for evaluation of sperm plasma membrane integrity in varicocele patients]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2011;17(11):984-8.
329. Isobe T. New method to estimate the possibility of natural pregnancy using computer-assisted sperm analysis. *Syst Biol Reprod Med.* 2012;58(6):339-47.
330. Yaniz JL, Vicente-Fiel S, Soler C, Recreo P, Carretero T, Bono A et al. Comparison of different statistical approaches to evaluate morphometric sperm subpopulations in men. *Asian J Androl.* 2016;18(6):819-23.
331. Lu JC, Huang YF, Lu NQ. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia.* 2014;46(4):329-38.
332. Vested A, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP, Thulstrup AM, Kristensen SL, Toft G. A comparison of conventional and computer-assisted semen analysis (CRISMAS software) using samples from 166 young Danish men. *Asian J Androl.* 2011;13(3):453-8.
333. Hu YA, Lu JC, Shao Y, Huang YF, Lu NQ. Comparison of the semen analysis results obtained from two branded computer-aided sperm analysis systems. *Andrologia.* 2013;45(5):315-8.
334. Dearing C, Jayasena C, Lindsay K. Can the Sperm Class Analyser (SCA) CASA-Mot system for human sperm motility analysis reduce imprecision and operator subjectivity and improve semen analysis? *Hum Fertil (Camb).* 2019:1-11.

335. Dearing CG, Kilburn S, Lindsay KS. Validation of the sperm class analyser CASA system for sperm counting in a busy diagnostic semen analysis laboratory. *Hum Fertil (Camb)*. 2014;17(1):37-44.
336. Kose M, Sokmensuer LK, Demir A, Bozdog G, Gunalp S. Manual versus computer-automated semen analysis. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2014;41(6):662-4.
337. Lammers J, Splingart C, Barriere P, Jean M, Freour T. Double-blind prospective study comparing two automated sperm analyzers versus manual semen assessment. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(1):35-43.
338. Urbano LF, Masson P, VerMilyea M, Kam M. Automatic Tracking and Motility Analysis of Human Sperm in Time-Lapse Images. *IEEE Trans Med Imaging*. 2017;36(3):792-801.
339. Wei SY, Chao HH, Huang HP, Hsu CF, Li SH, Hsu L. A collective tracking method for preliminary sperm analysis. *Biomed Eng Online*. 2019;18(1):112.
340. Elsayed M, El-Sherry TM, Abdelgawad M. Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J. *Theriogenology*. 2015;84(8):1367-77.
341. Kobori Y, Pfanner P, Prins GS, Niederberger C. Novel device for male infertility screening with single-ball lens microscope and smartphone. *Fertil Steril*. 2016;106(3):574-8.
342. Holmes E, Bjorndahl L, Kvist U. Hypotonic challenge reduces human sperm motility through coiling and folding of the tail. *Andrologia*. 2020:e13859.
343. Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1998;13(8):2139-46.
344. Canale D, Giorgi PM, Gasperini M, Pucci E, Barletta D, Gasperi M et al. Inter and intra-individual variability of sperm morphology after selection with three different techniques: layering, swimup from pellet and percoll. *J Endocrinol Invest*. 1994;17(9):729-32.
345. Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl*. 2012;14(2):260-9.
346. Volpes A, Sammartano F, Rizzari S, Gullo S, Marino A, Allegra A. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(6):765-70.
347. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:108.
348. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl*. 1988;9(6):367-76.
349. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril*. 1992;57(2):409-16.

350. Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007(4):Cd004507.
351. Simon L, Emery B, Carrell DT. Sperm DNA Fragmentation: Consequences for Reproduction. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1166:87-105.
352. Jayaraman V, Upadhya D, Narayan PK, Adiga SK. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(6):557-63.
353. Aitken RJ, Finnie JM, Muscio L, Whiting S, Connaughton HS, Kuczera L et al. Potential importance of transition metals in the induction of DNA damage by sperm preparation media. *Hum Reprod.* 2014;29(10):2136-47.
354. Muratori M, Tarozzi N, Cambi M, Boni L, Iorio AL, Passaro C et al. Variation of DNA Fragmentation Levels During Density Gradient Sperm Selection for Assisted Reproduction Techniques: A Possible New Male Predictive Parameter of Pregnancy? *Medicine (Baltimore).* 2016;95(20):e3624.
355. Björndahl L, Mohammadi M, Pourian M, Soderlund I, Kvist U. Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *J Androl.* 2005;26(2):170-3.
356. Oseguera-Lopez I, Ruiz-Diaz S, Ramos-Ibeas P, Perez-Cerezales S. Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and ICSI Outcomes. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:298.
357. International Standards Organization. ISO 15189:2012 Medical Laboratories – Requirements for Quality and Competence. Geneva 2012.
358. Lepine S, McDowell S, Searle LM, Kroon B, Glujovsky D, Yazdani A. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;7:CD010461.
359. Bucar S, Goncalves A, Rocha E, Barros A, Sousa M, Sa R. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(1):147-54.
360. Zafer M, Horvath H, Mmeje O, van der Poel S, Semprini AE, Rutherford G et al. Effectiveness of semen washing to prevent human immunodeficiency virus (HIV) transmission and assist pregnancy in HIV-discordant couples: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2016;105(3):645-55 e2.
361. Gilling-Smith C, Nicopoullou JD, Semprini AE, Frodsham LC. HIV and reproductive care--a review of current practice. *BJOG.* 2006;113(8):869-78.
362. Savasi V, Ferrazzi E, Lanzani C, Oneta M, Parrilla B, Persico T. Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples. *Hum Reprod.* 2007;22(3):772-7.
363. Fourie JM, Loskutoff N, Huyser C. Semen decontamination for the elimination of seminal HIV-1. *Reprod Biomed Online.* 2015;30(3):296-302.

364. Gilling-Smith C, Emiliani S, Almeida P, Liesnard C, Englert Y. Laboratory safety during assisted reproduction in patients with blood-borne viruses. *Hum Reprod.* 2005;20(6):1433-8.
365. Loutfy MR, Wu W, Letchumanan M, Bondy L, Antoniou T, Margolese S et al. Systematic review of HIV transmission between heterosexual serodiscordant couples where the HIV-positive partner is fully suppressed on antiretroviral therapy. *PLoS One.* 2013;8(2):e55747.
366. LeMessurier J, Traversy G, Varsaneux O, Weekes M, Avey MT, Niragira O et al. Risk of sexual transmission of human immunodeficiency virus with antiretroviral therapy, suppressed viral load and condom use: a systematic review. *CMAJ.* 2018;190(46):E1350-E60.
367. Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, Vernazza P, Collins S, van Lunzen J et al. Sexual Activity Without Condoms and Risk of HIV Transmission in Serodifferent Couples When the HIV-Positive Partner Is Using Suppressive Antiretroviral Therapy. *JAMA.* 2016;316(2):171-81.
368. Del Romero J, Rio I, Castilla J, Baza B, Paredes V, Vera M et al. Absence of transmission from HIV-infected individuals with HAART to their heterosexual serodiscordant partners. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(10):666-72.
369. Mahadevan M, Leeton JF, Trounson AO. Noninvasive method of semen collection for successful artificial insemination in a case of retrograde ejaculation. *Fertil Steril.* 1981;36(2):243-7.
370. Bunge RG, Keettel WC, Sherman JK. Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertil Steril.* 1954;5(6):520-9.
371. Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature.* 1953;172(4382):767-8.
372. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 1949;164(4172):666.
373. Clarke GN, Bourne H, Hill P, Johnston WI, Speirs A, McBain JC et al. Artificial insemination and in-vitro fertilization using donor spermatozoa: a report on 15 years of experience. *Hum Reprod.* 1997;12(4):722-6.
374. David G, Czyglik F, Mayaux MJ, Martin-Boyce A, Schwartz D. Artificial insemination with frozen sperm: protocol, method of analysis and results for 1188 women. *Br J Obstet Gynaecol.* 1980;87(11):1022-8.
375. Leibo SP, Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology.* 2002;57(1):303-26.
376. Perloff WH, Steinberger E, Sherman JK. Conception with Human Spermatozoa Frozen by Nitrogen Vapor Technic. *Fertil Steril.* 1964;15:501-4.
377. Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reprod Biomed Online.* 2004;9(2):134-51.

378. Keel BA, Webster BW. Semen cryopreservation methodology and results. In: Barratt CLR, Cooke ID, editors. Donor insemination. Cambridge: Cambridge University Press; 1993. p. 71-96.
379. Sherman JK. Cryopreservation of human semen. In: Keel BA, Webster BW, editors. CRC handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility. Boca Raton: CRC Press 1990. p. 229-59.
380. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, fertility, and development*. 1995;7(4):871-91.
381. Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. *Reproduction, fertility, and development*. 2003;15(7-8):377-81.
382. Nijs M, Creemers E, Cox A, Janssen M, Vanheusden E, Castro-Sanchez Y et al. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(2):202-6.
383. Guan HT, Zheng Y, Wang JJ, Meng TQ, Xia W, Hu SH et al. Relationship between donor sperm parameters and pregnancy outcome after intrauterine insemination: analysis of 2821 cycles in 1355 couples. *Andrologia*. 2016;48(1):29-36.
384. Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertil Steril*. 2006;86(3):721-2.
385. Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril*. 2005;84(4):1017.
386. Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Syst Biol Reprod Med*. 2015;61(1):1-12.
387. Oktay K, Harvey BE, Partridge AH, Quinn GP, Reinecke J, Taylor HS et al. Fertility Preservation in Patients With Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(19):1994-2001.
388. Corona G, Minhas S, Giwercman A, Bettocchi C, Dinkelman-Smit M, Dohle G et al. Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2019;25(6):733-57.
389. Kuczyński W, Dhont M, Grygoruk C, Grochowski D, Wołczyński S, Szamatowicz M. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa—a prospective randomized study. *Hum Reprod*. 2001;16(10):2109-13.
390. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Ramsay JW. Does the cause of obstructive azoospermia affect the outcome of intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *BJU Int*. 2004;93(9):1282-6.
391. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaili V et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(3):327-39.

392. Li K, Rodriguez D, Gabrielsen JS, Centola GM, Tanrikut C. Sperm cryopreservation of transgender individuals: trends and findings in the past decade. *Andrology*. 2018;6(6):860-4.
393. Starmer BZ, Baird A, Lucky MA. Considerations in fertility preservation in cases of testicular trauma. *BJU Int*. 2018;121(3):466-71.
394. Kamischke A, Jürgens H, Hertle L, Berdel WE, Nieschlag E. Cryopreservation of Sperm From Adolescents and Adults With Malignancies. *J Androl*. 2004;25(4):586-92.
395. Bourne H, Richings N, Liu DY, Clarke GN, Harari O, Baker HW. Sperm preparation for intracytoplasmic injection: methods and relationship to fertilization results. *Reproduction, fertility, and development*. 1995;7(2):177-83.
396. Hawksworth DJ, Szafran AA, Jordan PW, Dobs AS, Herati AS. Infertility in Patients With Klinefelter Syndrome: Optimal Timing for Sperm and Testicular Tissue Cryopreservation. *Rev Urol*. 2018;20(2):56-62.
397. Kirkman-Brown JC, Martins MV. 'Genes versus children': if the goal is parenthood, are we using the optimal approach? *Hum Reprod*. 2020;35(1):5-11.
398. Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S, Arnone A, Cognigni GE, Filicori M. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). *Fertil Steril*. 2012;98(4):870-5.
399. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*. 1995;346(8968):137-40.
400. Tomlinson M. Managing risk associated with cryopreservation. *Hum Reprod*. 2005;20(7):1751-6.
401. Perez-Sanchez F, Cooper TG, Yeung CH, al. e. Improvement in quality of cryopreserved human spermatozoa by swim-up before freezing. *Int J Androl*. 1994;17(3):115-20.
402. Machen GL, Harris SE, Bird ET, Brown ML, Ingalsbe DA, East MM et al. Utilization of cryopreserved sperm cells based on the indication for storage. *Investig Clin Urol*. 2018;59(3):177-81.
403. Liu S, Li F. Cryopreservation of single-sperm: where are we today? *Reprod Biol Endocrinol*. 2020;18(1):41.
404. Isachenko V, Rahimi G, Mallmann P, Sanchez R, Isachenko E. Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness. *Andrology*. 2017;5(6):1055-63.
405. Berkovitz A, Miller N, Silberman M, Belenky M, Itsykson P. A novel solution for freezing small numbers of spermatozoa using a sperm vitrification device. *Hum Reprod*. 2018;33(11):1975-83.

406. Li YX, Zhou L, Lv MQ, Ge P, Liu YC, Zhou DX. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2019;233:84-92.
407. Sánchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J. V., Isachenko, V., & Isachenko, E. Vitrified sperm banks: the new aseptic technique for human spermatozoa allows cryopreservation at -86 °C. *Andrologia.* 2012; 44(6):433-435.
408. Schulz, M., Risopatrón, J., Uribe, P., Isachenko, E., Isachenko, V., & Sánchez, R. Human sperm vitrification: A scientific report. *Andrology.* 2020;8(6):1642-1650.
409. Cooper TG, Atkinson AD, Nieschlag E. Experience with external quality control in spermatology. *Hum Reprod.* 1999;14(3):765-9.
410. Cooper TG, Björndahl L, Vreeburg J, Nieschlag E. Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *Int J Androl.* 2002;25(5):306-11.
411. Matson PL. External quality assessment for semen analysis and sperm antibody detection: results of a pilot scheme. *Hum Reprod.* 1995;10(3):620-5.
412. Mortimer D, Björndahl L, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U et al. A practical guide to basic laboratory andrology. 1st ed. Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press; In Press.
413. Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil Steril.* 1990;54(2):308-14.
414. Mortimer ST, Mortimer D. Quality and Risk Management in the IVF Laboratory. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2015:402.
415. Westgard JO. Foreword to the second edition. In: Westgard JO, editor. Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories. Madison, WI, USA: QC Publishing; 2002.
416. Bohring C, Krause W. The intra- and inter-assay variation of the indirect mixed antiglobulin reaction test: is a quality control suitable? *Hum Reprod.* 1999;14(7):1802-5.
417. Kuster CE, Singer RS, Althouse GC. Determining sample size for the morphological assessment of sperm. *Theriogenology.* 2004;61(4):691-703.
418. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986;1(8476):307-10.
419. Armitage P, Berry G, Matthews J. Statistical methods in medical research. Oxford: Blackwell Science; 2002:826
420. Motulsky H. Intuitive Biostatistics - A nonmathematical guide to statistical thinking. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2017:608
421. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo W.B. SAUNDERS COMPANY 1999:1917

422. Plaut DA, Westgard JOW. DC external quality assessment. In: Westgard JO, editor. Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories. Madison, WI, USA: QC Publishing; 2002. p. 125-63.
423. Cembrowski GS, Carey RN. Laboratory quality management. Chicago: ASCP Press; 1989.
424. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update. 2010;16(3):231-45.
425. Ford WC. Comments on the release of the 5th edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Asian J Androl. 2010;12(1):59-63.
426. MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoon counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. The Journal of urology. 1951;66(3):436-49.
427. Boyd JC. Defining laboratory reference values and decision limits: populations, intervals, and interpretations. Asian J Androl. 2010;12(1):83-90.
428. Björndahl L, Barratt CL, Mortimer D, Jouannet P. 'How to count sperm properly': checklist for acceptability of studies based on human semen analysis. Human reproduction (Oxford, England). 2016;31(2):227-32.
429. Ozarda Y, Sikaris K, Streichert T, Macri J, intervals ICoR, Decision L. Distinguishing reference intervals and clinical decision limits - A review by the IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits. Crit Rev Clin Lab Sci. 2018;55(6):420-31.
430. Ceriotti F, Henny J. "Are my Laboratory Results Normal?" Considerations to be Made Concerning Reference Intervals and Decision Limits. EJIFCC. 2008;19(2):106-14.
431. Gomez E, Aitken J. Impact of in vitro fertilization culture media on peroxidative damage to human spermatozoa. Fertil Steril. 1996;65(4):880-2.
432. Mortimer D, Mortimer ST. Essential features in media development for spermatozoa, oocytes and embryos. In: Quinn P, editor. Culture Media, Solutions and Systems in Human ART. Cambridge: Cambridge University Press; 2014. p. 47-67.
433. Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG. The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC, editor. Methods in Mammalian Embryology. San Fransisco, CA, USA: Freeman; 1971. p. 86-116.
434. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril. 1985;44(4):493-8.
435. Hotchkiss RS. Fertility in man. London: William Heineman Medical Books; 1945.
436. Eliasson R. Standards for investigation of human semen. Andrologia. 1971;3:49-64.
437. Lentner C. Geigy scientific tables. Vol. 1: Units of measurement, body fluids, composition of the body, nutrition. Basle: Ciba-Geigy Ltd; 1981:50.

9789240074118



9 789240 074118