



ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

**В.В. Долгов, С.А. Луговская, Н.Д. Фанченко,
И.И. Миронова, Е.К. Назарова, Н.Г. Ракова,
С.С. Раков, Т.О. Селиванов, А.М. Щелочков**



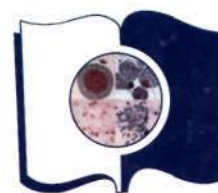
Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации



Российская медицинская академия последипломного образования

В.В. ДОЛГОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, Н.Д. ФАНЧЕНКО,
И.И. МИРОНОВА, Е.К. НАЗАРОВА, Н.Г. РАКОВА,
С.С. РАКОВ, Т.О. СЕЛИВАНОВ, А.М. ЩЕЛОЧКОВ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ



КАФЕДРА
КЛД

Москва 2006



ДОЛГОВ
Владимир
Владимирович

заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики РМАПО, профессор, доктор медицинских наук



ЛУГОВСКАЯ
Светлана
Алексеевна

профессор кафедры клинической лабораторной диагностики РМАПО, доктор медицинских наук



ФАНЧЕНКО
Николай
Дмитриевич

заведующий лабораторией эндокринологии Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, профессор, доктор медицинских наук



МИРОНОВА
Ирина
Ивановна

доцент кафедры клинической лабораторной диагностики РМАПО, кандидат медицинских наук



НАЗАРОВА
Елена
Константиновна

доцент кафедры клинической лабораторной диагностики РМАПО, кандидат медицинских наук



РАКОВА
Наталья
Геннадьевна

ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики РМАПО, кандидат медицинских наук



РАКОВ
Сергей
Сергеевич

доцент кафедры клинической лабораторной диагностики РМАПО, доктор медицинских наук



СЕЛИВАНОВ
Тимофей
Олегович

врач уролог-андролог медицинского центра «Профи-клиник»



ЩЕЛОЧКОВ
Алексей
Михайлович

заведующий отделом диагностической лаборатории медицинской компании «ИДК» (Самара), кандидат медицинских наук

УДК 616.69
ББК 56.9

Л12

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

Л12

Лабораторная диагностика мужского бесплодия / В.В. Долгов, С.А. Луговская, Н.Д. Фанченко, И.И. Миронова, Е.К. Назарова, Н.Г. Ракова, С.С. Раков, Т.О. Селиванов, А.М. Щелочков. – М.–Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2006. – 145 с., 199 ил. ISBN 5-94789-144-1

В последние десятилетия повсеместно увеличивается число бесплодных браков, в то же время активно внедряются вспомогательные репродуктивные технологии, которые требуют подробного лабораторного обследования мужчины. В книге обобщен опыт всестороннего лабораторного исследования репродуктивной функции мужчин с использованием традиционных и современных лабораторных технологий, подробно разбирается клинко-диагностическое значение исследования эякулята и тех факторов, которые могут повлиять на мужское бесплодие. Изложение материала основано на многолетнем опыте преподавания соответствующих разделов врачам клинко-диагностических лабораторий лечебных учреждений.

Книга предназначена для врачей клинко-диагностических лабораторий, врачей-андрологов и студентов медицинских вузов.

ББК 56.9

© В.В. Долгов, С.А. Луговская, Н.Д. Фанченко, И.И. Миронова, Е.К. Назарова, Н.Г. Ракова, С.С. Раков, Т.О. Селиванов, А.М. Щелочков, 2006

© Оформление, издание ООО «Издательство «Триада», 2006

ISBN 5-94789-144-1

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	– антиген	ПИФ	– прямая иммунофлюоресценция
АК	– аминокислота	ПНГП	– паранитрофенол- α -гликопиранозид
АКТГ	– адренокортикотропный гормон	ПНФ	– паранитрофенол
АР	– акросомальная реакция	ПРЛ (PRL)	– пролактин
АСАТ	– антиспермальные антитела	ПРФ (PRF)	– пролактин-рилизинг-фактор
АСБ	– андроген-связывающий белок	ПСА	– простата-специфический антиген
АТ	– антитело	ПСКФ	– простата-специфическая кислая фосфатаза
БСА	– бычий сывороточный альбумин	ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ВИЧ (HIV)	– вирус иммунодефицита человека	РМАПО	– Российская медицинская академия последипломного образования
ВМИ	– внутриматочная инсеминация	РТ	– ретикулярные тельца (хламидий)
ВОЗ (WHO)	– Всемирная организация здравоохранения	СТГ	– соматотропный гормон
ВПГ	– вирус простого герпеса	ТЗ	– трийодтиронин
ВРТ	– вспомогательная репродуктивная технология	Т4	– тироксин
ГнРГ (GnRH)	– гонадотропный рилизинг-гормон	ТРГ (TRH)	– тиреотропин-рилизинг-гормон
ГТБ	– гематотестикулярный барьер	ТТГ	– тиреотропный гормон
ГФХ	– гликофосфохолин	ТХУ	– трихлоруксусная кислота
ДГТ	– 5 α -дигидротестостерон	ТЭСГ (SHBG)	– тестостерон-эстрадиол-связывающий глобулин (секс-гормон-связывающий глобулин)
ДДС	– додецил-сульфат натрия	УЗИ	– ультразвуковое исследование
ИДС	– индекс дефектности сперматозоидов	ФБС	– фосфатно-буферная среда
ИКСИ (ICSI)	– интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида	ФСВОК	– Федеральная система внешней оценки качества (лабораторных исследований)
ИМА (MAI)	– индекс множественных аномалий (multiple anomalies index)	ФСГ (FSH)	– фолликулостимулирующий гормон
ИППП	– инфекции, передаваемые половым путем	ХГЧ (HGC)	– хорионический гонадотропин человека
ИТЗ (TZI)	– индекс тератозооспермии (teratozoospermia index)	цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
ИФА	– иммуноферментный анализ	ЦНС	– центральная нервная система
КДЛ	– клиничко-диагностическая лаборатория	ЭКО	– экстракорпоральное оплодотворение
КТ	– компьютерная томография	ЭТ	– элементарные тельца (хламидий)
ЛГ (LH)	– лютеинизирующий гормон	ЯМР	– ядерный магнитный резонанс
ЛПС	– липополисахариды	AZF	– azoospermia factor (фактор азооспермии)
МАО	– моноаминоксидаза		
МКБ-Х	– Международная классификация болезней, 10-й пересмотр		

CASA	– computer assay spermatozoa activity (метод компьютерного анализа подвижности сперматозоидов)	HSP ₉₀	– heatshock protein (ингибиторный белок)
CBAVD и CUAVD	– синдромы генитальной формы муковисцидоза	IGF-I	– инсулиноподобный фактор роста I
CFTR	– cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (трансмембранный регулятор проводимости)	MAR	– mixed antiglobulin reaction (смешанная реакция агглютинации)
DHEA	– дегидроэпиандростерон	NGF	– фактор роста нервов
DHEA-S	– дегидроэпиандростерон-сульфат	PmodS	– peritubular modifying substance (перитубулярная модифицирующая субстанция)
EGF	– эпидермальный фактор роста	StAR	– стероидогенный регуляторный белок
FAS	– рецепторы активационного апоптоза лимфоцитов	TGF	– трансформирующий фактор роста

ВВЕДЕНИЕ

Бесплодный брак как в нашей стране, так и за рубежом остается одной из важнейших ключевых социальных и медицинских проблем. По данным ВОЗ частота бесплодного брака составляет 10–15% от общего числа супружеских пар и не имеет тенденции к снижению. При этом только у 30% пар с бесплодным браком имеет место стерильность у одного из супругов, а от 40 до 60% пар в результате лечения могут иметь собственных детей. На женщину традиционно падает ответственность за неудачу в наступлении беременности. Такой взгляд основан на псевдологическом заключении о том, что «если она не беременна, то, значит, в этом и виновата». В действительности обращает на себя внимание тенденция к росту удельного веса мужского фактора (рис. 1). За последние 20 лет он изменился с 30 до 50% и продолжает расти, поэтому исследование репродуктивной функции мужчины – актуальная задача. При этом обследование мужчин характеризуется гораздо меньшим риском для здоровья, так как в большинстве случаев не требует применения инвазивных процедур, может быть выполнено в более короткие сроки и с меньшими затратами, нежели у женщин.



Рис. 1. Причины бесплодных браков по данным ВОЗ (WHO, 1987)

Современные медицинские технологии позволяют справиться с большей частью проблем, однако они часто связаны с крупными материальными затратами. На первое место по важности необходимо поставить правильное и полноценное исследование причин бесплодия. Дополнительные затраты, связанные с применением современных исследовательских технологий, окупаются снижением затрат на необоснованное или ошибочное лечение, а факт снижения риска для здоровья, связанный с различного рода вмешательствами, сопровождающими лечение, вообще трудно переоценить.

Репродуктивная функция человека – наиболее тонкая и наименее защищенная. В 1992 г. (Carlsen et al., 1992) были проанализированы публикации относительно качества спермы, изданные с 1930 г. На основании взвешенной линейной регрессии авторы доказали хроническое прогрессирующее уменьшение среднего объема эякулята с 3,40 мл в 1940 г. до 2,75 мл в 1990 г. При подобном анализе концентрации сперматозоидов выявилось очевидное прогрессирующее ее снижение от 113 млн/мл в 1940 г. до 66 млн/мл в 1990 г., одновременно с прогрессирующим уменьшением в пропорции лиц с концентрацией сперматозоидов более 100 млн/мл. Не было выявлено влияния возраста на качество спермы. При обследовании во Франции 1750 мужчин с доказанной фертильностью в течение 20-летнего периода (Auger, 1995) наблюдалось снижение во всех классических параметрах качества спермы, выявлено падение концентрации сперматозоидов в эякуляте на 3,3% с каждым годом жизни. Таким образом, показана глобальная тенденция к ухудшению качества спермы.

Причины, которые ведут к снижению качества спермы, до настоящего времени неясны. Принято считать, что факторы образа жизни (стресс, питание, курение, алкоголь) оказывают

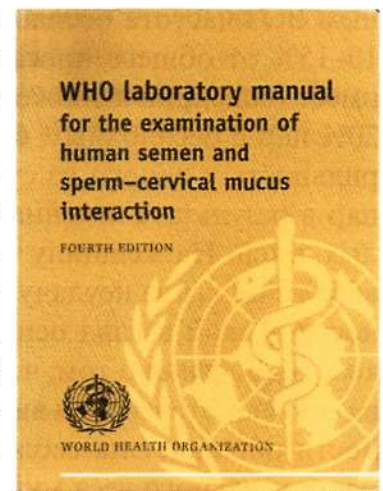
неблагоприятное воздействие на мужскую репродуктивную систему, в то же время существует гипотеза воздействия химических факторов окружающей среды, обладающих эстрогенной активностью (ксеноэстрогены) и способных взаимодействовать с эндокринной системой у мужчин. В связи с этим вопросы раннего выявления, качественной диагностики заболеваний мужской репродуктивной системы представляют актуальную медицинскую проблему. Среди методов лабораторно-инструментального исследования важнейшим и часто достаточным для определения функционального состояния половых желез и фертильности мужчин является исследование эякулята.

Одним из наиболее важных моментов лабораторных исследований является постоянный контроль качества полученных результатов. При этом лаборатории, осуществляющие исследования эякулята, должны проводить как внутрिलाбораторный контроль для всех применяемых тестов (в том числе с использованием контрольных материалов), так и участвовать в межлабораторном внешнем контроле качества (системы ФСВОК, LABQUALITY и др.).

Как и при любом другом методе исследования, для спермограммы важно соблюдение принципов диагностической значимости, эффективности, объективности, стандартизации. Принцип *диагностической значимости* метода предполагает клинически доказанное значение полученных лабораторных результатов в постановке диагноза. Учитывая, что материальные затраты на исследования достаточно высоки и часто ложатся на пациента, необходимо исключать малоинформативные, спорные или дублирующие тесты. Использование стандартных протоколов обследования, анализа-

торов, готовых наборов реагентов и т. п. повышает эффективность, объективность, сводит к минимуму человеческий фактор. Соблюдение принципа *стандартизации* методов дает уверенность, что исследования, произведенные в разных лабораториях одному пациенту, можно сопоставлять. Это также дает возможность применять критерии интерпретации результатов в выборе тактики лечения бесплодной пары. Для соблюдения этих принципов необходимо использование единого (стандартного) протокола исследования. В настоящее время таким общепризнанным протоколом является документ «Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята и сперм-цервикального взаимодействия» (4-я редакция, 1999 г.). Это руководство переведено на русский язык, настоящее пособие подготовлено в соответствии с Руководством ВОЗ.

Цель данной книги – представить современные возможности лабораторного исследования репродуктивной функции мужчины, унифицировать лабораторное заключение по этим исследованиям, дать клинико-диагностическую интерпретацию получаемых в лаборатории результатов, представить современные возможности лабораторных технологий, помочь врачам-androлогам и врачам лабораторий создать совместно наиболее эффективные протоколы исследования в конкретном лечебно-диагностическом учреждении.



МУЖСКАЯ РЕПРОДУКТИВНАЯ СИСТЕМА

Строение мужской половой системы

Мужские половые органы состоят из половых желез – яичек с их оболочками и придатками, расположенными в мошонке, семявыносящих

путей, добавочных половых желез и полового члена (рис. 2).

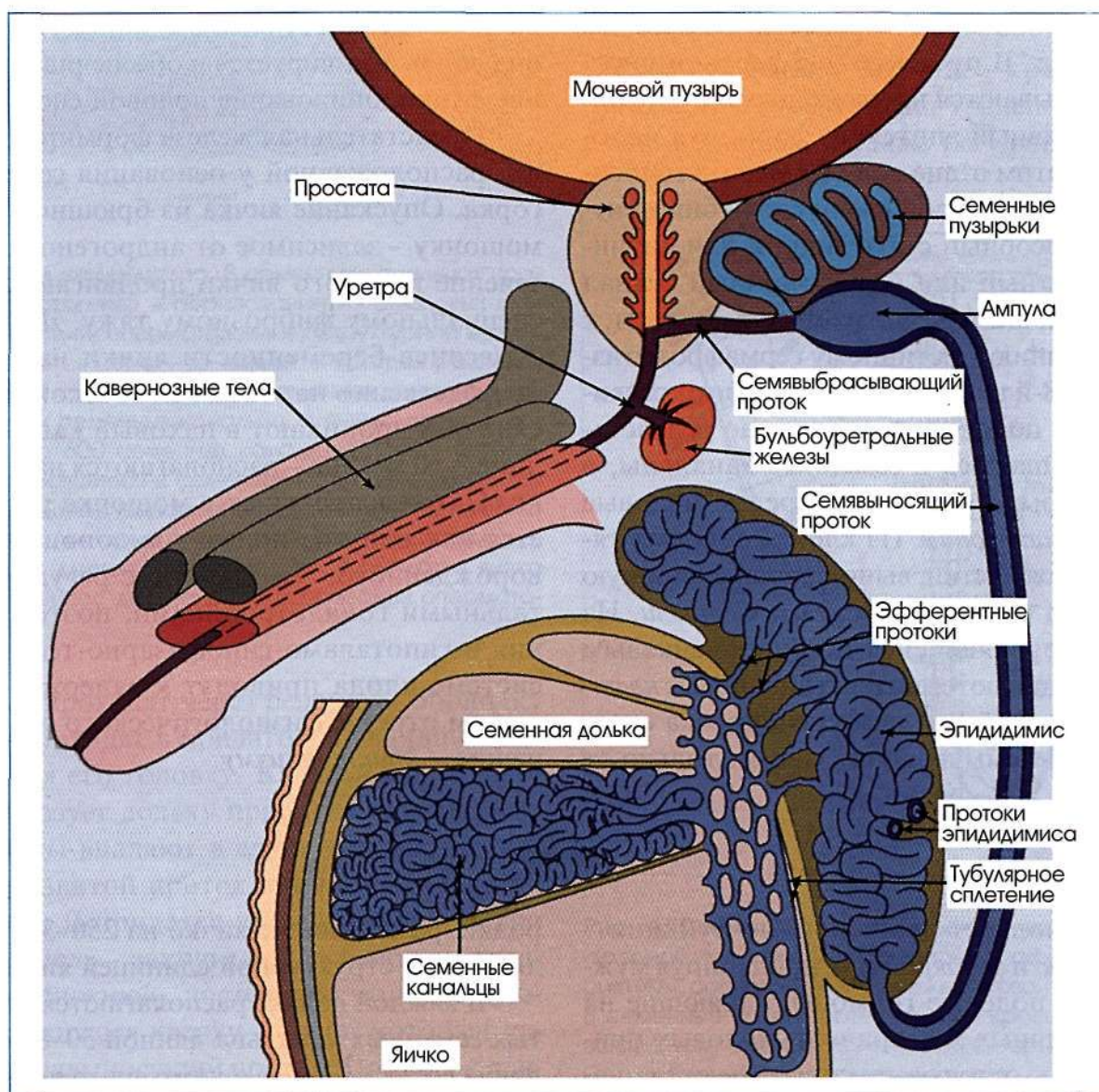


Рис. 2. Строение мужской половой системы. К мужским половым органам относят наружные (половой член и мошонка) и внутренние (яички, их придатки, семявыносящие протоки, добавочные половые железы). Яичко – место сперматогенеза, эпидидимис (придаток яичка) является частью семявыводящих путей, служит резервуаром накопления спермы и созревания сперматозоидов. К добавочным половым железам относят предстательную железу, семенные пузырьки и бульбоуретральные железы

Развитие половых желез

Половые органы тесно связаны с мочевыводящими и формируются из первичной почки зародыша – *mesonephros*. Первичные половые клетки (*гоноциты*) образуются в стенке желточного мешка, на 5-й неделе эмбрионального развития мигрируют в гонадные валики, которые располагаются на средней части мезонефрального гребня и представляют собой зачатки будущих гонад – яичников или яичек. В течение последующих двух недель гоноциты многократно делятся путем митоза, формируя популяцию предшественников гамет. Нарушение их развития и заселения ими гонадных валиков может привести к дефектам развития гонад. В процессе дифференцировки гоноциты оказываются погруженными в первичный герминативный эпителий, формируя половые тяжи. На этом этапе гонады уже гистологически различимы и представляют собой бипотентный орган, способный стать яичком или яичником. Неадекватный или недостаточный сигнал для их последующего развития может привести к редкому состоянию – истинному гермафродитизму. Начиная с 8-й недели эмбрионального развития первичные половые тяжи активно разрастаются и превращаются в семенные канальцы, в просвете которых находятся незрелые половые клетки – *сперматогонии*. Из клеток половых тяжей развиваются клетки, выполняющие опорную и трофическую функции, – *клетки Сертоли*. Из мезенхимы, появляющейся под зародышевым эпителием, развиваются интерстициальные *клетки Лейдига*. Дальнейшая дифференцировка органов половой системы целиком зависит только от

продуктов секреции яичка. Тестостерон, синтезируемый тестикулярными клетками, которые в дальнейшем становятся клетками Лейдига, стимулирует развитие придатков яичка, семявыносящих протоков и семенных пузырьков. Образование тестостерона эмбриональными яичками уже с 7–8-й недели внутриутробного развития контролируется плацентарным гормоном – хорионическим гонадотропином. Ось гипоталамус–гипофиз–гонады начинает функционировать у мальчиков с 10-й по 24-ю недели эмбрионального развития, после чего выключается более чем на 10 лет. С наступлением полового созревания она вновь активируется и обеспечивает нормальное функционирование половой системы.

Предстательная железа формируется из ткани, расположенной у основания семенного бугорка. Опускание яичка из брюшной полости в мошонку – зависимое от андрогенов событие, в течение которого яички продвигаются вниз по специальному фиброзному тяжу. До последних 3 месяцев беременности яички находятся непосредственно над паховой связкой. На 8-м месяце они проникают в паховый канал, а в середине 9-го месяца – располагаются на дне мошонки. Нахождение яичек в мошонке рассматривается как один из признаков доношенности новорожденного. Этот процесс регулируется фетальными гонадотропинами, поэтому нарушения в гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной системе плода приводят к задержке яичка на любом отрезке физиологического пути его опущения – *крипторхизму*.

Яичко

Яичко выполняет две основные функции – *репродуктивную* и *эндокринную*, продуцируя мужские гаметы и половые гормоны, влияющие на развитие первичных и вторичных половых признаков. Яички – парные органы, имеющие несколько уплощенно-овальную форму. До периода полового созревания яички и придатки развиваются медленно, затем рост их ускоряется. Яичко покрыто плотной соединительно-тканной оболочкой, от которой радиально отходят перего-

родки, разделяющие яичко на 250–300 долек, являющихся структурной единицей яичек (рис. 3).

В каждой дольке располагаются по 1–3 извитых семенных канальца длиной 50–80 см. Общая длина всех канальцев одного яичка достигает 300–400 м. Вблизи средостения канальцы постепенно выпрямляются, переходят в прямые канальцы и впадают в сеть яичка, расположенную в средостении (тестикулярное сплетение). Канальцы сети открываются в 15–20 выносящих канальцев яич-

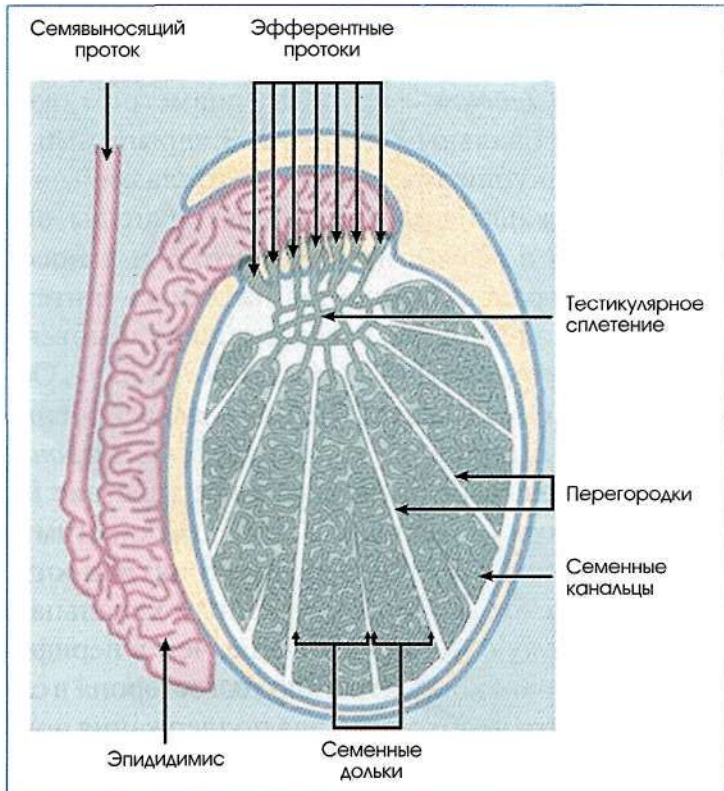


Рис. 3. Яичко и эпидидимис. В семенных канальцах происходит сперматогенез – образование из стволовых клеток (сперматогоний) сперматозоидов. Структурной единицей яичка являются семенные дольки, в которых расположены семенные канальцы. Каждая семенная долька содержит 1–3 извитых семенных канальца. В яичке мужчины содержится около 600 семенных канальцев. Сперматозоиды, сформировавшиеся в семенных канальцах, попадают через эфферентные (выносящие) протоки в придаток яичка (эпидидимис), который представляет собой систему канальцев общей длиной до 4–6 метров. В придатке яичка происходит процесс дальнейшего созревания сперматозоидов

ка, которые проходят через белочную оболочку и, извиваясь, входят в придаток яичка (эпидидимис), образуя его головку. Каждый выносящий каналец образует дольку придатка. Все выносящие каналцы впадают в единственный штопорообразно извитой проток придатка, имеющий длину 4–6 м. В придатке яичка различают три части: верхнюю – закругленную головку, среднюю – тело, нижнюю, постепенно утончающуюся и загибающуюся кверху – хвост, который переходит в семявыносящий проток. Придаток яичка, являясь хранилищем сперматозоидов в течение 12–14 дней, выполняет важную функцию в их дальнейшем созревании. Только после прохождения через придаток яичка сперматозоиды приобретают окончательную оплодотворяющую спо-

собность. Проток придатка яичка переходит в семявыносящий проток, который входит в состав семенного канатика. Семявыносящий проток проходит через паховый канал, направляясь ко дну мочевого пузыря, где оба протока сближаются. Конечный отдел семявыносящего протока, расширяясь, образует ампулу, сливается с выводными протоками семенных пузырьков и формирует семяизвергающий (семявыбрасывающий) проток длиной около 2 см, который проходит через предстательную железу и открывается узким щелевидным отверстием на семенном бугорке задней части мочеиспускательного канала.

Кровоснабжение яичек

Яички имеют хорошее кровоснабжение (рис. 4), что обеспечивает транспорт гормонов и их метаболитов, а также регуляцию температу-

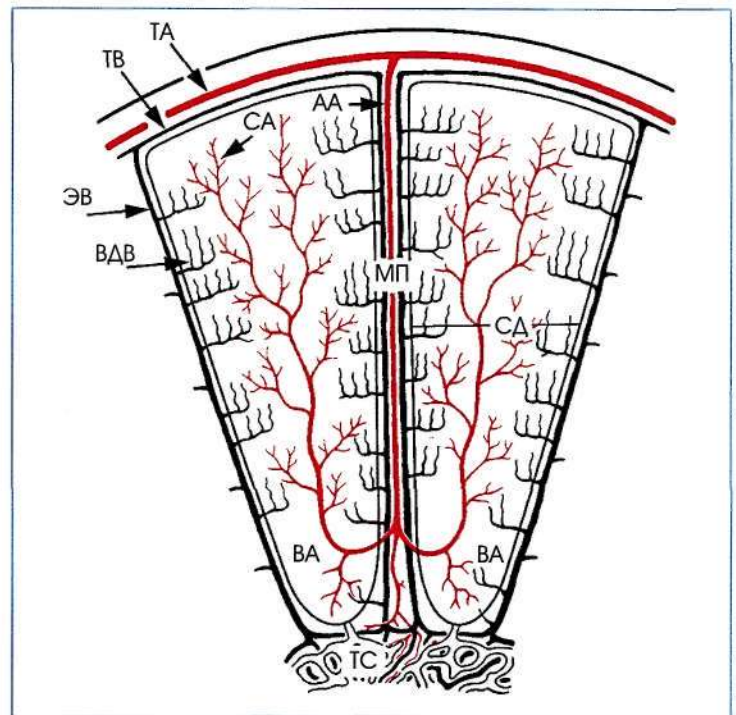


Рис. 4. Схема кровоснабжения яичка. Кровь из тестикулярной артерии (ТА) поступает в афферентную артерию (АА), расположенную в междольковой перегородке (МП). В семенные дольки артериальная кровь поступает через возвратные артерии (ВА) и сегментарные артерии (СА). Сегментарные артерии имеют четкую архитектуру, расположены на расстоянии примерно 300 мкм друг от друга и формируют капилляры, которые доходят до каждой клетки Лейдига. Оттекает кровь соответственно по внутридольковым (ВДВ), эфферентным (ЭВ) и тестикулярной (ТВ) венам. ТП – тестикулярная перегородка, ТС – тестикулярное сплетение, СД – семенная долька

ры яичек. У мужчин температура яичек на 2–3 °С ниже температуры тела и на 1,5–2,5 °С выше температуры кожи мошонки. Поддержание низкой температуры внутри яичек обеспечивается двумя механизмами: 1) тонкой кожей мошонки; 2) специфическим сосудистым сплетением, в котором вены густо оплетают тестикулярные междольковые артерии. При **варикоцеле** (варикозном расширении вен семенного канатика) происходит локальный венозный застой, гипоксемия и нарушение терморегулирующей функции мошонки, в результате повышается температура внутри яичек. Сочетанное воздействие перечисленных неблагоприятных факторов может приводить к нарушению гематотестикулярного барьера, аутоиммунному поражению сперматогенного эпителия, что способствует развитию бесплодия.

Клеточный состав яичек

Интерстициальная (межканальцевая) ткань (рис. 5) занимает 12–15% общего объема яичек. Она состоит из рыхлой соединительной ткани, содержащей кровеносные сосуды, отдельные лимфатические капилляры, макрофаги, тучные клет-

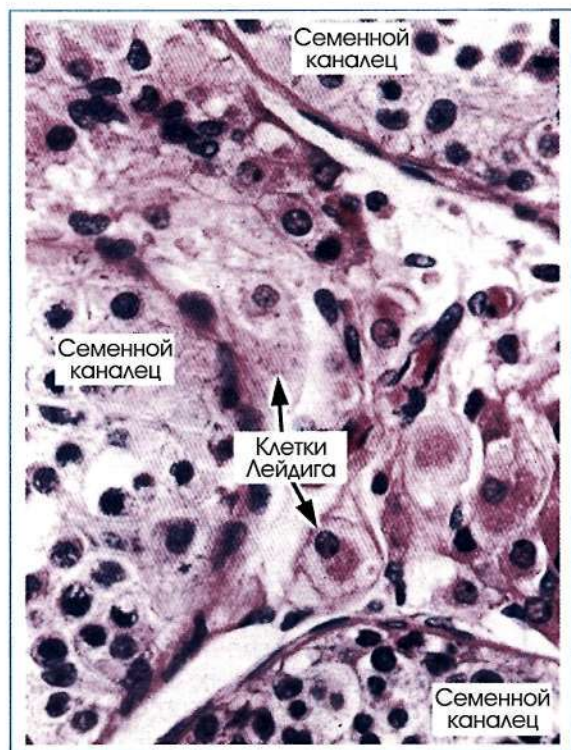


Рис. 5. Межканальцевая (интерстициальная) ткань яичка. Основными ее компонентами являются клетки Лейдига, продуцирующие тестостерон

ки и клетки Лейдига (интерстициальные эндокриноциты).

Клетки Лейдига – крупные, диаметром около 20 мкм с овальным ядром, 1–2 ядрышками и пенистой вакуолизированной цитоплазмой, нередко содержащей липофусциновые гранулы, образующиеся в результате эндоцитоза и лизосомальной деградации липидов на этапах синтеза стероидных гормонов. Всего в яичках человека присутствует около 200×10^6 клеток Лейдига. Основной функцией клеток Лейдига является синтез мужского полового гормона *тестостерона*, который оказывает разностороннее действие на различные чувствительные к нему клетки, стимулируя их рост и функциональную активность. Близость клеток Лейдига к семенным канальцам создает высокую (в 10 раз больше, чем в периферической крови) концентрацию тестостерона в самом яичке, что необходимо для поддержания нормального сперматогенеза внутри комплекса клетки Сертоли – сперматогенные клетки. Кроме тестостерона, клетки Лейдига продуцируют активин, способствующий выработке фолликулостимулирующего гормона (ФСГ). Пролиферативная активность клеток Лейдига в яичках достаточно низкая и зависит от стимулирующего воздействия лютеинизирующего гормона (ЛГ) гипофиза.

Не менее важными клетками интерстициальной ткани являются макрофаги и лимфоциты, представляющие в интерстициальной ткани компоненты иммунной системы. На 10–50 клеток Лейдига приходится 1 макрофаг. Одной из важных функций резидентных макрофагов яичка, как и других тканей, является удаление апоптотных клеток. Кроме того, они участвуют в стероидогенезе, секретируя 25-гидроксихолестерол, который соседними клетками Лейдига может метаболизироваться в тестостерон. Взаимодействие макрофагов и клеток Лейдига опосредовано секрецией ряда цитокинов.

Семенные канальцы занимают 60–80% объема яичек. В них содержатся 2 типа соматических клеток – перитубулярные клетки и клетки Сертоли, а также клетки сперматогенеза (см. раздел «Сперматогенез»).

Перитубулярные клетки, или миофибробласты (рис. 6), прилегают к базальной мембране. Они являются малодифференцированными миоцитами, которые потенциально способны к со-

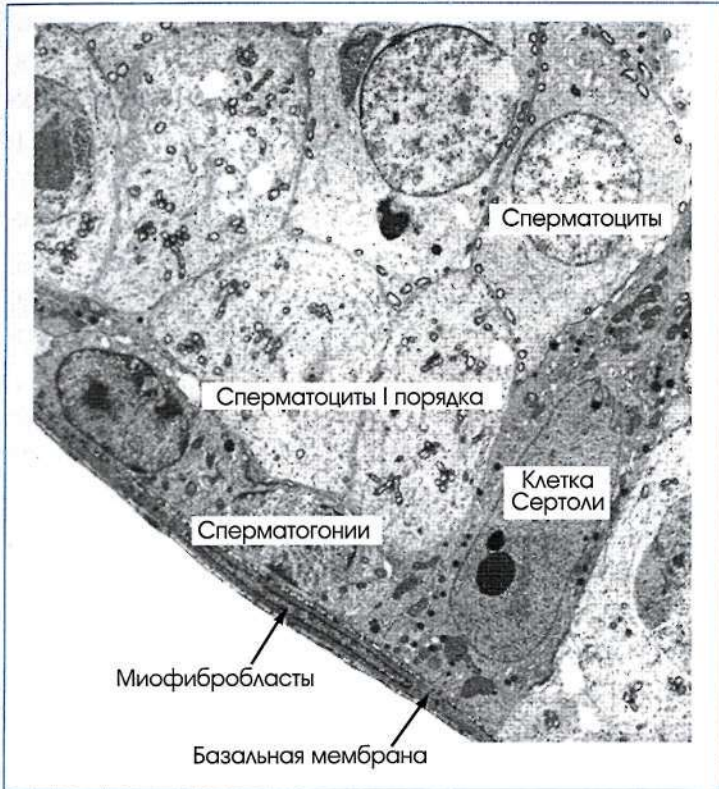


Рис. 6. Перитубулярные клетки и клетки, примыкающие к базальной мембране. Мало дифференцированные миоциты при снижении сперматогенеза в яичках увеличивают синтетическую активность. В этих случаях утолщается стенка протоков фибриновыми элементами и развивается гиалинизация семенных канальцев. К базальной мембране примыкают клетки Сертоли и сперматогенные клетки ранних этапов дифференцировки (сперматогонии, сперматоциты I порядка)

кращению. По-видимому, за счет сокращения этих клеток сперма продвигается по семенным канальцам. Регуляторами активности миофибробластов являются окситоцин, простагландины и эндогенные стероиды. Перитубулярные клетки исходно не содержат актин, однако тестостерон может индуцировать его синтез и тем самым активировать дифференцировку и усиление их сократительной активности. При снижении сперматогенеза в яичках увеличивается синтетическая активность миофибробластов, в результате стенка протоков утолщается фибриновыми элементами и развивается гиалинизация семенных канальцев.

Извитые семенные канальцы выстланы клетками Сертоли (поддерживающие эпителиоциты, sustentocytes) и сперматогенным эпителием, состоящим из сперматогенных клеток на разных стадиях развития.

Клетки Сертоли своим основанием лежат на стенке семенного канальца, а апикальным концом обращены в его просвет. Они соединены между собой плотными контактами, благодаря чему сперматогенные клетки располагаются в двух ярусах. В наружном базальном слое находятся сперматогонии, во внутреннем адлюминальном слое – сперматоциты, сперматиды и сперматозоиды (рис. 7, 8). Поэтому сперматогонии примыкают к базальной мембране и имеют доступ к пи-

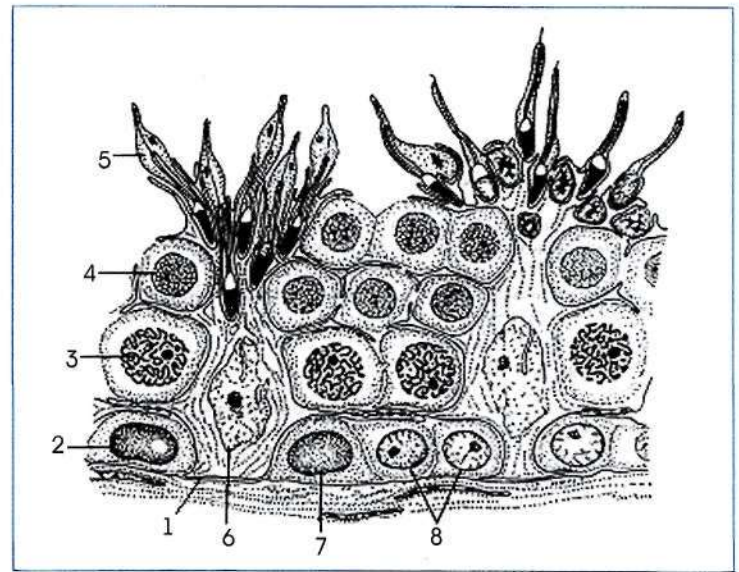


Рис. 7. Эпителий семенных канальцев. Между клетками Сертоли и сперматогенными клетками сформирована неразрывная связь: 1 – базальная мембрана; 2 – темные сперматогонии; 3 – сперматоциты; 4 – округлая сперматиды; 5 – продолговатая сперматиды; 6 – клетка Сертоли; 7 – светлые сперматогонии типа А; 8 – сперматогонии типа В

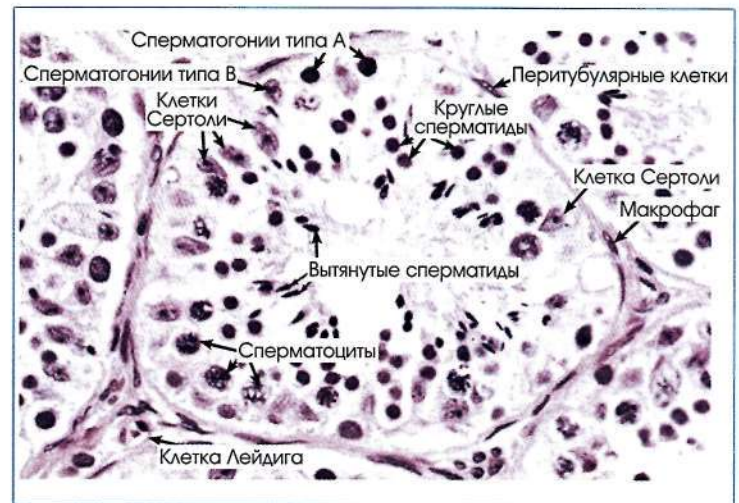


Рис. 8. Клетки извитого семенного канальца – сперматогонии, сперматиды, клетки Сертоли. В межканальцевой ткани располагаются клетки Лейдига

тательным веществам, тогда как клетки, расположенные ближе к просвету канальцев, не имеют прямого доступа к тканевой жидкости. Плотные контакты между клетками Сертоли препятствуют ее проникновению. Таким образом, делящиеся сперматоциты, сперматиды и сперматозоиды получают питательные вещества опосредованно через цитоплазму клеток Сертоли. Клетки Сертоли имеют большой размер (20–40 мкм), неправильную, грушевидную форму ядра, неравномерное распределение хроматина. В цитоплазме видны жировые включения. Морфология клеток Сертоли тесно связана с их физиологическими функциями. Цитоплазма содержит как гладкий эндоплазматический ретикулум (**синтез стероидов**), так и шероховатый (**белковый синтез**), развитый аппарат Гольджи (**хранение, окончательный синтез и секреция продуктов**), лизосомальные гранулы (**фагоцитоз**), микротрубочки и филаменты (**изменение формы в разные фазы созревания половых клеток**).

Клетки Сертоли выполняют ряд функций, обеспечивающих нормальное развитие сперматогенных клеток:

- трофическая;
- фагоцитарная;
- участие в формировании гематотестикулярного барьера;
- эндокринная.

Трофическая функция клеток Сертоли по отношению к клеткам сперматогенеза состоит в доставке им кислорода и питательных веществ из тканевой жидкости. Клетки Сертоли участвуют в фагоцитозе цитоплазматических фрагментов сперматид, а также сперматозоидов, значительная часть которых погибает путем апоптоза в тканях яичка. Плотные контакты между клетками Сертоли формируют гематотестикулярный барьер, обеспечивающий иммунологическое изолирование сперматогенных клеток от крови. Сложность поддержания целостности гематотестикулярного барьера состоит в том, что при переходе каждой последовательной волны дифференцирующихся клеток из базальной области в адлюминальную им предстоит пройти через зону

плотных контактов. Для сохранения барьера, препятствующего проникновению ряда веществ, эти контакты должны открываться и снова закрываться, работая подобно системе шлюзов. Поддержание гематотестикулярного барьера препятствует попаданию антигенов зрелых половых клеток в кровотоки, в результате чего снижается опасность развития аутоиммунного воспалительного процесса, приводящего к нарушению сперматогенной функции яичек.

Клетки Сертоли активно участвуют в сперматогенезе. Под влиянием ФСГ они синтезируют андроген-связывающий белок (АСБ), который переносит тестостерон к клеткам сперматогенеза. Клетки Сертоли секретируют такие факторы, как ингибин, активин, фоллистатин, цитокины (интерлейкины 1 и 6), факторы роста, опиоиды, стероиды, простагландины, модуляторы клеточного деления и т. д. Они координируют процесс сперматогенеза, поддерживая развитие определенного числа герминативных клеток. Количество клеток Сертоли существенно увеличивается в пубертатном периоде. Андрогены и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) повышают их число и количество экспрессированных на поверхности маркеров активации. В свою очередь клетки Сертоли стимулируют процесс гаметогенеза, активируя последовательную трансформацию сперматогоний в сперматоциты. Любое воздействие в момент развития репродуктивной системы, которое ведет к снижению числа клеток Сертоли, в конечном итоге отразится на продуктивности герминативного эпителия (нарушение сперматогенеза) у взрослого мужчины.

Клетки Сертоли – основной продуцент жидкости семенных канальцев, часть которой вновь реабсорбируется. Точный состав секрета клеток Сертоли не установлен. Известно, что в нем по сравнению с плазмой крови имеет место повышенная концентрация ионов K^+ и сниженная концентрация Na^+ , содержатся HCO_3^- , Cl^- , Mg^{2+} , инозитол, глюкоза и некоторые белки. Таким образом, клетки Сертоли поддерживают процесс гаметогенеза и формируют уникальную среду для сперматозоидов.

Придаток яичка (эпидидимис)

Сперматозоиды из семенных протоков, смешиваясь с секретом клеток Сертоли, выходят через тубулярное сплетение в тестикулярные эфферентные протоки. 12–18 эфферентных протоков, каждый по 0,2–0,5 м длиной, формируют эпидидимис. В протоках эпидидимиса сперма находится 2–14 дней; здесь под влиянием андрогенов происходит окончательное морфологическое, биохимическое и физиологическое дозревание сперматозоидов.

Эфферентные протоки придатка яичка выстланы многослойным переходным эпителием (реснитчатым и гладким), который адсорбирует ионы и воду из протоков в интерстициальное пространство, тем самым уменьшая ее объем в просвете придатка, секретирует специфические макромолекулы, взаимодействующие со сперматозоидами и обуславливающие созревание их мембран. Сперматозоиды обволакиваются защитной гликопротеиновой оболочкой, придающей им отрицательный заряд, в них происходит ряд ультраструктурных и цитохимических преобразований акросомы, стабилизация хроматина ядра и плотных фибрилл жгутика. Слабое напряжение кислорода и отсутствие фруктозы препятствуют активации сперматозоидов. Деятельность эпителиальных клеток эпидидимиса в значительной степени контролируется гормонами яичка. Около базальной мембраны расположена популяция тканевых макрофагов и лимфоцитов. Макрофаги фагоцитируют цитоплазматические капли, «сброшенные» с шейки созревших сперматозоидов, а при застое спермы макрофаги и эпителиальные клетки способны захватывать старые сперматозоиды, превращаясь в спермиофаги эпидидимиса. Фиксированные клетки обеспечивают как резорбцию, так и секрецию, создавая микроокружение для сперматозоидов. В результате всех этих процессов сперма концентрируется и сперматозоиды окончательно созревают.

В эпидидимальной сперме присутствуют в высокой концентрации 3 низкомолекулярных

компонента: гликофосфохолин (ГФХ), синтезируемый эпителием из циркулирующих липопротеинов; L-карнитин, который не синтезируется, а концентрируется из системы циркуляции, и миоинозитол, который частично синтезируется эпителием. Количество ГФХ и миоинозитола широко варьирует в семенной плазме здоровых мужчин, поэтому практически не используется для диагностических целей. Предполагается, что карнитин участвует в переносе жирных кислот через мембрану сперматозоида и увеличивает подвижность сперматозоидов, проходящих через придаток яичка. Несколько протеолитических ферментов в неактивной форме присутствуют в секрете эпидидимиса, в частности α -глюкозидаза. Отсутствие α -глюкозидазы в семенной плазме трактуется при азооспермии как показатель окклюзии дистального отдела семявыносящих путей.

Сперматозоиды в придатке приобретают подвижность и способность связываться с мембраной ооцита. В то же время в семенной жидкости эпидидимиса, благодаря присутствию стабилизаторов, активность сперматозоидов несколько снижена по сравнению с таковой в женских половых путях, где они претерпевают изменения, называемые *капацитацией* (рис. 9).



Рис. 9. Оплодотворяющая способность спермы в зависимости от стадий дозревания сперматозоидов в яичках, эпидидимисе и при активации их в женских половых путях

Семявыносящий проток

Семявыносящий проток – парный трубчатый орган длиной до 50 см и шириной просвета 0,2–0,5 см, служит для транспортировки сперматозоидов из эпидидимиса. При эякуляции происходит сокращение продольных мышеч-

ных волокон семявыносящего протока, сперматозоиды из ампулы и конечного отдела эпидидимиса поступают в семявыбрасывающий проток и смываются содержимым семенных пузырьков в уретру.

Добавочные половые железы

К добавочным половым железам мужской половой системы относят *семенные пузырьки, предстательную железу и бульбоуретральные железы*.

Вклад секрета семенных пузырьков и предстательной железы в общий объем семенной жидкости составляет 95% (около 35% приходится на секрет предстательной железы, 60% – на секрет семенных пузырьков), и только 5% приходится на секрет гонад, поэтому колебания объема эякулята в первую очередь зависят от секрета добавочных половых желез.

Семенные пузырьки

Семенные пузырьки (рис. 10) – парный железистый орган, расположенный над предстательной железой. Семенные пузырьки своей передней поверхностью прилегают ко дну мочевого пузыря, а задней – к передней стенке ампулы прямой кишки. Выводной проток семенного пузырька сливается с семявыносящим протоком, образуя семявыбрасывающий проток, проникающий через предстательную железу и открывающийся на семенном бугорке задней части мочеиспускательного канала. Стенка семенного пузырька состоит из наружного соединительно-тканного слоя мышечных волокон и слизистой оболочки, образующей многочисленные складки, выстланные однослойным цилиндрическим эпителием. Семенные пузырьки являются андрогензависимыми секреторными органами. Секрет семенных пузырьков вязкий, желатинообразной консистенции, беловато-серого цвета, без запаха, имеет рН 7,3, содержит азотистые вещества, простагландины, белки в частности, семиногелин, соли аскорбиновой и лимонной кислот, фруктозу и другие вещества. Секрет семенных пузырьков составляет ос-

новной объем эякулята. Наиболее важной функцией семенных пузырьков является секреция *фруктозы*, уровень которой – косвенный показатель андрогенной насыщенности организма. Кроме того, фруктоза обеспечивает энергетический потенциал сперматозоидов, повышает их выживаемость и функциональную активность. Нор-

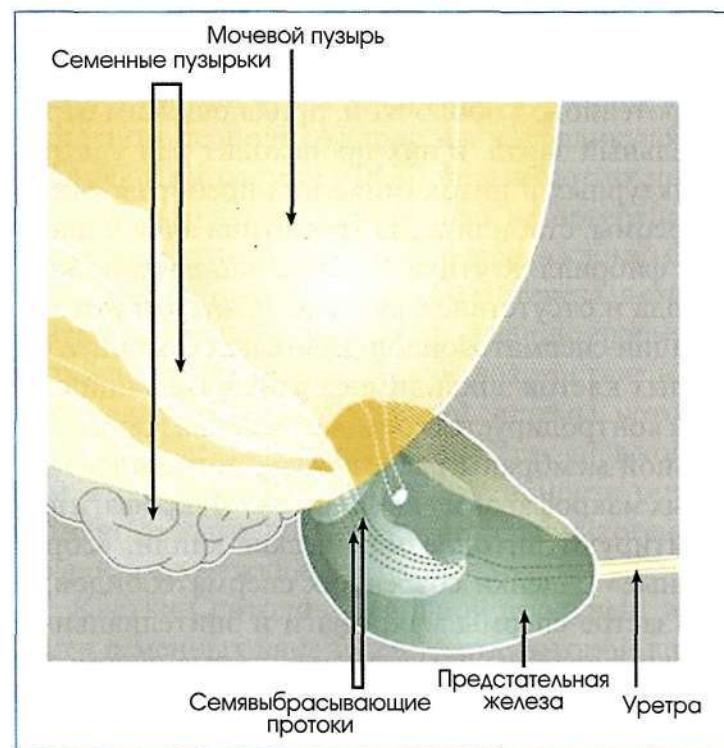


Рис. 10. Семенные пузырьки и предстательная железа. Секрет семенных пузырьков составляет около 60% объема семенной плазмы, имеет желатинообразную консистенцию, что обеспечивает вязкость эякулята. Важной функцией семенных пузырьков является секреция фруктозы – основного энергетического субстрата, обеспечивающего подвижность сперматозоидов. Секрет предстательной железы составляет около 35% объема семенной плазмы. Ферменты секрета предстательной железы принимают участие в процессах разжижения эякулята. Он оказывает антимикробное, буферное и ферментативное действие на эякулят в целом

мальная концентрация фруктозы в спермоплазме составляет 6,7–33,3 мкмоль/мл. Снижение уровня фруктозы в спермоплазме сопровождается нарушением жизнеспособности сперматозоидов.

Бульбоуретральные железы

Бульбоуретральные (Куперовы) железы – парные округлые железы небольшой величины, расположенные между пучками мышц мочеполовой диафрагмы. Выводной проток железы тонкий, длиной 3–4 см, открывается в просвет мочеиспускательного канала. Железы вырабатывают вязкий секрет, представляющий собой бесцветную, прозрачную слизь щелочной реакции, выделяемый в период полового возбуждения. Секрет нейтрализует кислую реакцию мочевых путей перед эякуляцией. В пожилом возрасте железы атрофируются.

Парауретральные железы

Парауретральные железы – мелкие гроздьевидные трубчато-альвеолярные железы, расположенные в подслизистом слое уретры на всем ее протяжении, выделяют также слизистый секрет, который, как и секрет бульбоуретральных желез, поддерживает благоприятную для сперматозоидов щелочную реакцию в уретре.

Предстательная железа

Предстательная железа – железисто-мышечный орган, охватывающий мочеиспускательный канал ниже мочевого пузыря (рис. 10). Предстательная железа состоит из 30–50 трубчато-альвеолярных желез с большим количеством гладкомышечных волокон между ними. Выводные протоки предстательной железы открываются в задней части уретры. У мальчиков предстательная железа состоит главным образом из мышечной соединительной ткани, железистая ткань выражена слабо. С наступлением полового созревания предстательная железа активно растет, преимущественно за счет желез, которые затем к старости редуцируются. Эпителий желез предстательной железы – однослойный цилиндрический или кубический, выводные протоки выстланы переходным эпителием. Основная функция предста-

тельной железы – выработка секрета, необходимого для поддержания активности и жизнедеятельности сперматозоидов. Предстательная железа вырабатывает в сутки до 2 мл секрета, составляющего 25–35% объема семенной плазмы. Регуляция функции предстательной железы осуществляется андрогенами, поэтому при снижении их уровня секреторная активность предстательной железы значительно падает. Секрет предстательной железы, полученный после ее массажа, представляет собой беловатую, опалесцирующую, вязкую жидкость со специфическим запахом и рН 6,3–6,4. Специфический запах секрета обуславливает спермин, а беловатый опалесцирующий цвет ему придают мицеллы фосфолипидов (липоидные тельца). При охлаждении в эякуляте появляются кристаллы фосфата спермина. Спермин и спермидин, являясь основаниями, поддерживают на постоянном уровне концентрацию водородных ионов. Секрет предстательной железы содержит простагландины, ферменты – гиалуронидазу, фибринолизин и фиброкиназу, которые способствуют разжижению эякулята. Он оказывает антимикробное, буферное и ферментативное действие на эякулят в целом, активируя движение сперматозоидов.

С момента полового созревания в секрете предстательной железы резко возрастает содержание **лимонной кислоты и кислой фосфатазы**, концентрация которых увеличивается параллельно с повышением содержания тестостерона и угасает с прекращением его образования в яичках. По их значениям можно судить о состоянии клеток Лейдига, т. е. об андрогенной функции яичек, а также о функциональном состоянии предстательной железы.

Простата-специфическая кислая фосфатаза (ПСКФ) – изофермент кислой фосфатазы, представляющий собой гликопротеин с молекулярной массой 97 кДа. Предполагают, что кислая фосфатаза участвует в гидролизе фосфолипидов, увеличивая содержание фосфата и холина в эякуляте, последний оказывает сенсibiliзирующий эффект на сперматозоиды.

Существенное влияние на подвижность сперматозоидов и оплодотворяющие свойства эякулята оказывают такие микроэлементы, как **железо, магний, марганец и цинк**. Их секреция осуществляется в основном предстательной желе-

зой. Особое внимание в настоящее время придано исследованию содержания катионов цинка, биологическая роль которого многообразна. Цинк – важный внутриклеточный микроэлемент, принимающий активное участие в физиологии мужской репродуктивной системы. В настоящее время известно, что цинк оказывает модулирующее воздействие на систему регуляции гипоталамус–гипофиз–гонады у мужчин. Центральное действие цинка заключается в угнетении синтеза пролактина, относительном повышении уровня гонадотропных гормонов – ФСГ и ЛГ. Периферическое действие цинка на тестикулярный стероидогенез реализуется путем усиления чувствительности рецепторов клеток Лейдига к гонадотропным гормонам, что стимулирует синтез тестостерона. Цинк принимает участие в сперматогенезе. Он входит в состав более 70 внутриядерных ферментов, катализирующих ключевые этапы синтеза ДНК и РНК, поэтому цинк улучшает процессы деления и дифференцировки сперматозоидов. Цитрат цинка является важным компонентом секрета предстательной железы, улучшающим подвижность сперматозоидов в эякуляте. Кроме того, цинк является мощным фактором антиоксидантной защиты и обладает способностью стабилизировать мембраны клеток, а также оказывать иммуномодулирующее действие на Т-клеточную систему иммунитета. При обследовании больных с идиопатической олигозооспермией, леченных препаратами цинка, установлено, что увеличение его концентрации в спермоплазме приводит к повышению подвижности сперматозоидов. В то же время отмечается, что увеличение

концентрации катионов цинка бывает в спермоплазме и у бесплодных мужчин.

Концентрация ионов цинка в нормальном эякуляте составляет около 2,08 ммоль/л.

Простата-специфический антиген (ПСА) – это физиологический экскреторный продукт предстательной железы, гликопротеин с молекулярной массой 36 кДа, относящийся к калликреинам. ПСА является протеазой, уменьшающей вязкость спермы. Верхней границей нормы ПСА у здоровых мужчин является 4 нг/мл. Значительное повышение уровня ПСА в сыворотке крови обнаруживают при раке предстательной железы, а также при воспалительных заболеваниях и аденоме простаты. Определение ПСА весьма эффективно для раннего обнаружения рецидивов рака предстательной железы. При этом важна динамика уровня ПСА, а не отдельные значения.

Предстательная железа, эпидидимис и семявыносящие протоки сокращаются при эякуляции одновременно, семенные пузырьки – на заключительном этапе, поэтому в последней порции эякулята практически не содержится сперматозоидов. Таким образом, в формировании эякулята участвуют все добавочные половые железы. При их нормальном функционировании образуется оптимальный состав спермальной плазмы.

Основными маркерами добавочных половых желез в спермальной плазме являются:

- для семенных пузырьков – *фруктоза*;
- для секрета предстательной железы – *ионы цинка, кислая фосфатаза, лимонная кислота и ПСА*;
- для секрета придатка яичек – *нейтральная α -глюкозидаза*.

Сперматогенез

Сперматогенез – это процесс, в результате которого из первичных половых клеток формируются сперматозоиды. Сперматогенез начинается в период половой зрелости и продолжается в течение всей жизни. Сперматогенез состоит из трех последовательных фаз: пролиферации сперматогоний, мейоза и спермиогенеза (рис. 11). В процессе сперматогенеза сперматогенные клетки по мере созревания перемещаются от базальной мембраны к просвету извитого канальца.

На базальной мембране извитых семенных канальцев находятся **сперматогонии**. Общее их количество в яичке человека составляет около 1 млрд. Сперматогонии морфологически разделяются на 2 популяции: А и В. В свою очередь сперматогонии типа А различаются по степени конденсации хроматина в ядре на темные (конденсированный хроматин) и светлые клетки (диффузный хроматин), содержащие ядрышки вблизи ядерной мембраны. **Темные сперматогонии типа А** в обычных условиях

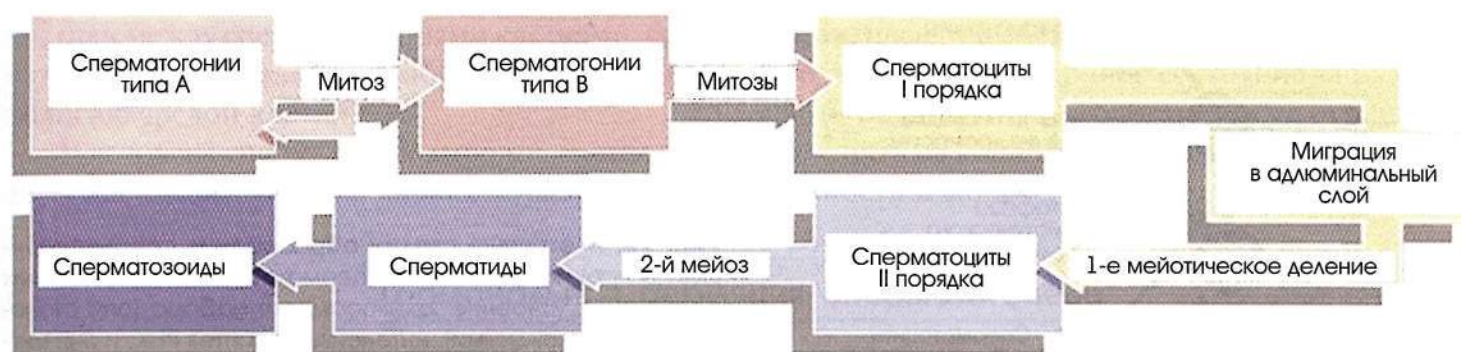


Рис. 11. Стадии сперматогенеза. В процессе митотических делений сперматогонии превращаются в сперматоциты I порядка, которые проходят два мейотических деления, преобразуясь в сперматоциты II порядка и сперматиды. Сперматиды в процессе спермиогенеза созревают в сперматозоиды

не проявляют пролиферативной активности. Это резервные стволовые клетки, которые переходят в состояние митоза, когда количество сперматогоний значительно снижается, в частности после радиационного облучения. Восстановление сперматогенной функции и нормального сперматогенеза может происходить только за счет сперматогоний типа А, так как все остальные клетки сперматогенного эпителия необратимо дифференцированы.

Некоторые темные сперматогонии типа А превращаются в **светлые сперматогонии типа А**, которые непрерывно делятся путем митоза. Светлые сперматогонии типа А являются обновляющимися стволовыми клетками, которые дают равное количество дочерних клеток типов А и В. В результате деления светлой клетки типа А образуются либо две сперматогонии типа В, либо одна сперматогония типа В и одна светлая сперматогония типа А. Для превращения светлой сперматогонии в сперматогонию типа В требуется четыре последовательных митотических деления, при которых генетически клетки не меняются, но происходит их морфофункциональная перестройка. **Сперматогонии типа В** не всегда располагаются на базальной мембране. Они отличаются от сперматогоний типа А светлым округлым ядром с хорошо конденсированным хроматином. Сперматогонии типа В проходят несколько митотических делений, дифференцируясь в **сперматоциты I порядка**. Эти клетки соединены между собой цитоплазматическими мостиками, в результате чего образуется синцитий, клетки которого составляют клон. В процессе развития сперматоциты I порядка сначала удва-

ивают свое количество хромосом, а затем проходят первое мейотическое деление, в результате которого образуется два **сперматоцита II порядка** (рис. 12). После второго мейоза сперматоциты дифференцируются в четыре **сперматиды**, имеющие гаплоидный набор хромосом (22 аутосомы и 1 половая хромосома). Процесс первого мейотического деления у человека занимает несколько недель, тогда как второе завершается в течение 8 часов. Суммарно из одной стволовой сперматогонии образуются 64 сперматиды. Генетически сперматиды представляют конечный продукт мейоза, но, прекращая деление, они подвергаются глубоким преобразованиям, превращаясь в сперматозоиды.

Третий период сперматогенеза – **спермиогенез** – сложный процесс превращения сперматид в **сперматозоиды**. Сперматиды лежат в углублениях плазматической мембраны клеток Сертоли. Происходит последовательная трансформация округлых сперматид в вытянутые, сопровождающаяся перестройкой внутриклеточных органелл (рис. 13). Вначале в цитоплазме сперматиды идет интенсивное развитие аппарата Гольджи. Сперматиды имеют округлую форму, ядро сферическое с диффузным хроматином. Комплекс Гольджи формирует гранулы, которые сливаются между собой, образуя акросомальную гранулу, контактирующую с апикальной частью ядра. Сформировавшаяся акросома содержит протеолитические ферменты (гиалуронидазу, трипсиноподобный акрозин), которые при контакте с яйцеклеткой разрушают ее прозрачную зону. При отсутствии или недоразвитии акросомы сперматозоид

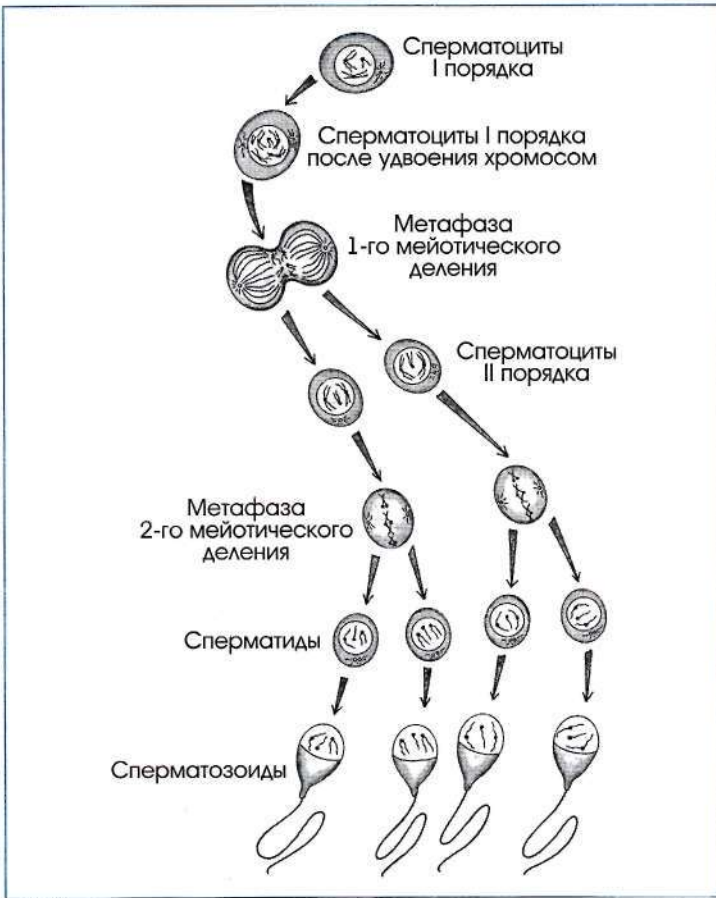


Рис. 12. Клеточные стадии образования сперматозоидов. В процессе развития сперматоцитов I порядка в них происходит удвоение хромосомного набора (они становятся тетраплоидными), интенсивный синтез РНК, и они мигрируют в адлюминальный слой семенных канальцев. Критическим в процессе гаметогенеза является мейоз сперматоцитов с образованием сначала **сперматоцитов II порядка** (диплоиды), а затем **сперматид**, имеющих гаплоидный набор хромосом. В конечном итоге из одного сперматоцита I порядка образуются 4 сперматиды, содержащие гаплоидный набор хромосом (22 аутосомы и 1 половая хромосома). Сперматиды дифференцируются в **сперматозоиды**. Процесс сперматогенеза продолжается около 64 дней. При этом профазы первого мейоза продолжается до 3 недель, тогда как остальные фазы первого мейоза и все стадии второго мейоза происходят в течение 1–2 дней. После второго мейотического деления сперматиды уже не могут делиться митозом. Происходит трансформация сперматид из круглых в вытянутые с последовательными перестройками внутриклеточных органелл. Из сперматид формируются сперматозоиды

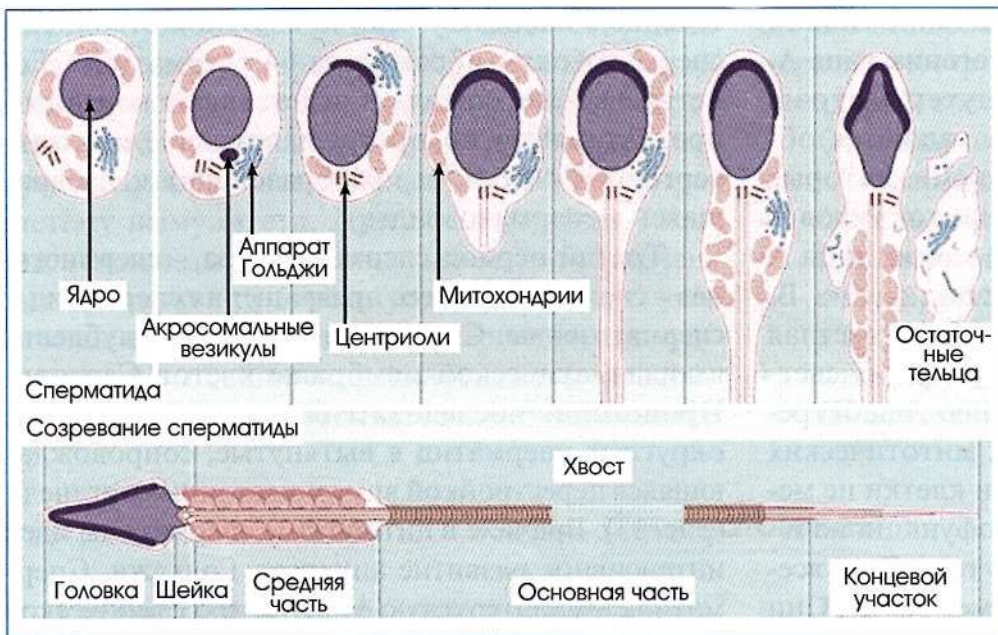


Рис. 13. Дифференцировка сперматиды приводит к образованию круглой, а затем продолговатой сперматиды, развитию акросомальных гранул и формированию из них акросомальной шапочки на головке, конденсации митохондрий в средней части и отшнуровыванию большей части цитоплазмы, формированию хвоста

теряет способность проникать в яйцеклетку. Формирование вытянутой сперматиды характеризуется тем, что ее ядро удлиняется, начинается конденсация хроматина, формируется осевая нить хвостика, митохондрии передвигаются к месту соединения головки и хвоста и образуют небольшой промежуточный участок (шейку). В процес-

се спермиогенеза существенно уменьшается количество цитоплазмы. Большая ее часть образует остаточное тельце, которое отделяется от клетки и фагоцитируется клетками Сертоли (суспендоцитами). Меньшая часть цитоплазмы покрывает тонким слоем ядро, связующую промежуточную часть и осевую нить хвостика. На этой стадии

спермиогенеза разрываются цитоплазматические мостики между сперматогенными клетками, сперматозоиды оказываются свободными, имея морфологию зрелой клетки.

У человека сперматогенез продолжается около 64 дней, каждый час в яичках образуется около

100 млн сперматозоидов. Этот процесс наиболее активен при 34 °С, поэтому избыток тепла или длительное лихорадочное состояние за 2–3 месяца до оценки сперматогенеза могут отрицательно влиять на количество сперматозоидов, их подвижность и морфологическое строение.

Гормональная регуляция сперматогенеза

В табл. 1 представлены данные о гормонах гипоталамуса, влияющих на репродуктивную функцию. В литературе используется как старая, так и новая номенклатура для обозначения этих

гормонов. В табл. 1 приведены обе номенклатуры и аббревиатуры, используемые для обозначения этих гормонов.

Таблица 1

Основные гормоны, определяющие репродуктивную функцию мужчин

Гормон		Аббревиатура	Структура	Основной эффект	Образование
Новая номенклатура	Старая номенклатура				
Гонадолиберин	Гонадотропный рилизинг-гормон	ГнРГ (GnRH)	Декапептид (10 АК)	Секреция лютропина (ЛГ), фоллитропина (ФСГ) и пролактина (ПРЛ)	Гипоталамус
Пролактилиберин	Пролактин-рилизинг-фактор	ПРФ (PRF)	Белок (28 АК)	Секреция пролактина	Гипоталамус
Пролактостатин	Пролактин-ингибирующий фактор		Дофамин	Подавляет секрецию пролактина	Гипоталамус
Тиролиберин	Тиреотропин-рилизинг-гормон	ТРГ (TRH)	Пептид (3 АК)	Секреция тиреотропина (ТТГ) и пролактина	Гипоталамус
Фоллитропин	Фолликулостимулирующий гормон	ФСГ (FSH)	Гликопротеин (204 АК)	Сперматогенез	Гипофиз
Лютропин	Лютеинизирующий гормон	ЛГ (LH)	Гликопротеин (204 АК)	Продукция тестостерона в клетках Лейдига	Гипофиз
Хорионический гонадотропин	Хорионический гонадотропин человека	ХГЧ (HGC)	Гликопротеин (241 АК)	Продукция тестостерона в клетках Лейдига	Трофобласт, плацента
Пролактин	Пролактин	ПРЛ (PRL)	Белок (198 АК)	Образование половых гормонов	Гипофиз
Андрогены, в том числе тестостерон	Тестостерон		Стероид	Сперматогенез, развитие половых органов и признаков, либидо, белковый синтез, строение соединительной ткани, мышц и костей, гемопоэз	Яички, кора надпочечников
Ингибин	Ингибин		Гликопротеин (94 АК)	Уменьшение секреции ФСГ	Яички
Активин	Активин		Гликопротеин (94 АК)	Повышение секреции ФСГ	Яички

Примечание. АК – аминокислоты.

Ось гипофиз-гипоталамус-гонады

Гормональная регуляция мужской репродуктивной системы включает несколько уровней: центральную нервную систему, гипофиз, гонады, органы и периферические ткани-мишени, на которые воздействуют половые гормоны (рис. 14).

Участие центральной нервной системы (ЦНС) в репродуктивной функции осуществляется через гипоталамус, где синтезируются и секретируются

рилизинг-факторы (либерины) и ингибирующие факторы (статины).

Гонадотропный рилизинг-гормон

Гонадотропный рилизинг-гормон (ГнРГ), или гонадолиберин, представляет собой декапептид (состоит из 10 аминокислот), секреция кото-

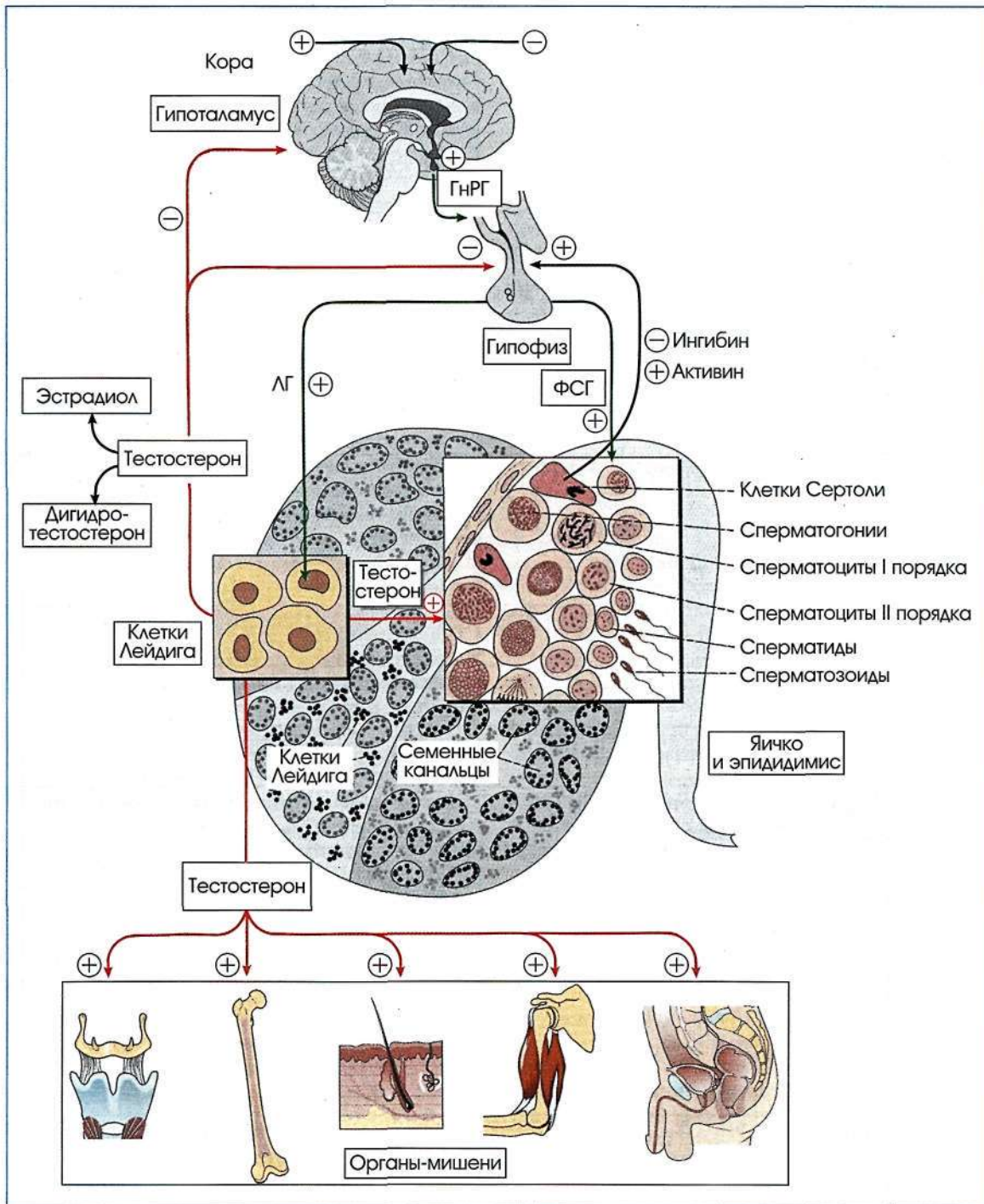


Рис. 14. Гормональная регуляция функции яичек и эффекты андрогенов

рого гипоталамусом имеет пульсовой характер (с периодом примерно 2 часа) и находится под влиянием ряда нейромедиаторов и гормонов, в том числе дофамина, пролактина, катехоламинов, эндорфинов и половых стероидов. Время полужизни ГнРГ составляет менее 10 мин, он быстро разрушается под влиянием нескольких пептидаз гипофиза. ГнРГ поступает в переднюю долю гипофиза и, воздействуя на его специфические клетки, стимулирует выработку гонадотропных гормонов. Репродуктивную функцию регулируют три гонадотропных гормона: фолликулостимулирующий (ФСГ), лютеинизирующий (ЛГ) и пролактин (ПРЛ), секреция которых регулируется по принципу обратной связи: при снижении концентрации определенного гормона в крови соответствующие клетки гипоталамуса вырабатывают ГнРГ, который поступает по разветвлениям аксонов в переднюю долю гипофиза. В ответ на это клетки передней доли гипофиза выделяют гонадотропные гормоны, стимулирующие образование половых гормонов. И наоборот, повышение содержания гормона в крови является сигналом для клеток гипоталамуса прекратить выработку ГнРГ. Клетки гипофиза отвечают на это замедлением секреции и освобождением гонадотропных гормонов, что приводит к подавлению секреции половых гормонов. У мужчин основным гормоном, контролирующим секрецию ГнРГ, является тестостерон, который подавляет секрецию гонадотропинов по механизму обратной связи как на уровне гипоталамуса, так и гипофиза. Таким же ингибирующим эффектом, как у тестостерона, обладают продукты его метаболизма – 5 α -дигидротестостерон (ДГТ) и эстрадиол. Среди нейромедиаторов секрецию ГнРГ стимулируют норадреналин и дофамин, ингибируют – серотонин и эндорфины.

Фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), или фоллитропин, и лютеинизирующий гормон (ЛГ), или лютропин, – гликопротеины, синтез которых зависит от частоты и амплитуды пульсирующих выбросов ГнРГ в гипоталамусе. В норме пики ГнРГ наблюдаются с интервалом 90–120 минут, увеличение или уменьшение частоты таких им-

пульсов приводит к преобладанию секреции гипофизом ЛГ или ФСГ. При увеличении частоты импульсов синтезируется преимущественно ЛГ, при уменьшении – ФСГ. Когда пики следуют с интервалом менее 20 минут или наблюдается секреция в постоянном режиме, происходит угнетение функции гонад в результате истощения секретирующих клеток гипофиза. Пульсовая секреция ЛГ полностью повторяет пульсацию ГнРГ, в то же время выбросы ФСГ происходят с большим периодом. Это, по-видимому, связано с различной «продолжительностью жизни» этих гормонов: период полувыведения ЛГ в сыворотке крови составляет 20 мин, а ФСГ – 180–200 мин. Секреция ФСГ, помимо ГнРГ, контролируется и другими гормонами, включая тестостерон и ингибин, которые угнетают его продукцию; активин – увеличивает ее.

ЛГ и ФСГ имеют общий принцип строения с другими гликопротеиновыми гормонами, такими, как тиреотропный гормон (ТТГ) и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). Они состоят из двух полипептидных цепей: α -цепь (субъединица) одинакова для всех гормонов, β -цепь, хотя структурно схожа, придает каждому гормону определенную специфичность. ЛГ и ФСГ имеют разные терминальные гликозиды, что определяет разный период их полувыведения из системы циркуляции. ЛГ богат N-ацетилглюкозаминсульфатом и быстро удаляется из системы циркуляции, так как взаимодействует со специфическими рецепторами на гепатоцитах, которые распознают сульфатные группировки. ФСГ имеет сиалированные окончания, что защищает его от метаболического поглощения в печени, поэтому он длительно циркулирует в крови.

У детей до пубертатного периода концентрация ЛГ и ФСГ в крови низкая (рис. 15). Несмотря на многочисленные исследования эндокринных изменений у детей, пока неясен механизм гормональных перестроек при взрослении мальчика в мужчину.

Синтез гормонов активизируется в период полового созревания импульсами из ЦНС, а также такими факторами, как масса тела и лептин (гормон, вырабатываемый клетками жировой ткани). Продукция ЛГ и ФСГ продолжается в течение всего репродуктивного возраста. Основным ингибитором высвобождения ЛГ является тестосте-

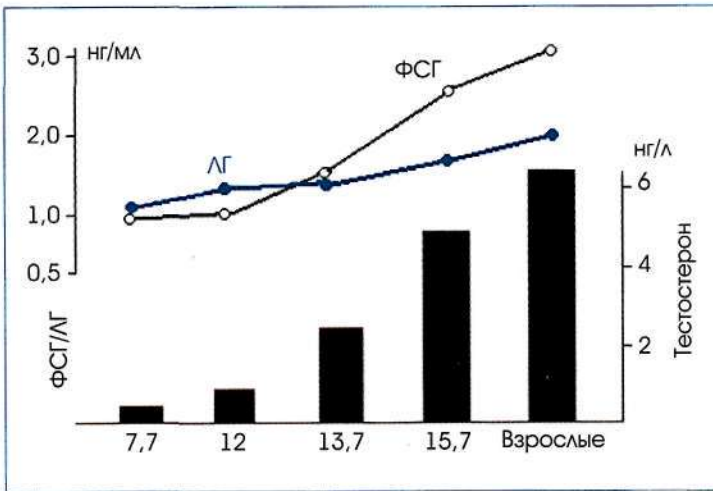


Рис. 15. Концентрация гонадотропинов и тестостерона у мальчиков. До пубертатного периода концентрация ЛГ и ФСТ в крови низкая, затем она существенно повышается. ЛГ быстро удаляется из системы циркуляции, так как взаимодействует со специфическими рецепторами на гепатоцитах. ФСТ длительно циркулирует в крови

рон, для ФСТ – ингибин В и фоллистатин (гормоны, вырабатываемые клетками Сертоли). Стимулирует секрецию гонадотропных гормонов активин. Высокая концентрация тестостерона по механизму обратной связи подавляет секрецию гонадотропинов (рис. 16), что может привести даже к уменьшению количества сперматозоидов в эякуляте.

Органами-мишенями гонадотропных гормонов у мужчин являются яички, где под действием

ЛГ происходит синтез половых гормонов (тестостерона, эстрогенов), которые оказывают воздействие на специфические рецепторы клеток-мишеней в самих гонадах и других органах. Структура рецепторов для ЛГ и ФСТ представлена на рис. 17. Кроме того, ФСТ через клетки Сертоли стимулирует сперматогенез и развитие семявыносящих канальцев.

Методические аспекты определения ФСТ и ЛГ

Высокоспецифичные и чувствительные тест-системы для определения ФСТ и ЛГ на основе двухэтапного иммунохимического анализа коммерчески доступны и предлагаются многими производителями тест-систем. Как правило, в этих тест-системах в разных вариантах используются связывающие и проявляющие антитела для разных эпитопов гормонов: одно антитело против α -субъединицы, другое – против β -субъединицы гормона. При исследовании методом ELISA на твердой фазе конечный сигнал пропорционален концентрации гормона, тогда как при РИА конечный регистрируемый сигнал обратно пропорционален концентрации гормона. При использовании метода иммунофлюоресценции, как правило, конечный флюоресцирующий продукт формируется при образовании низкомолекулярного хелатного комплекса на молекуле металла. В этом случае в процессе связывания антител практически не происходит изменения

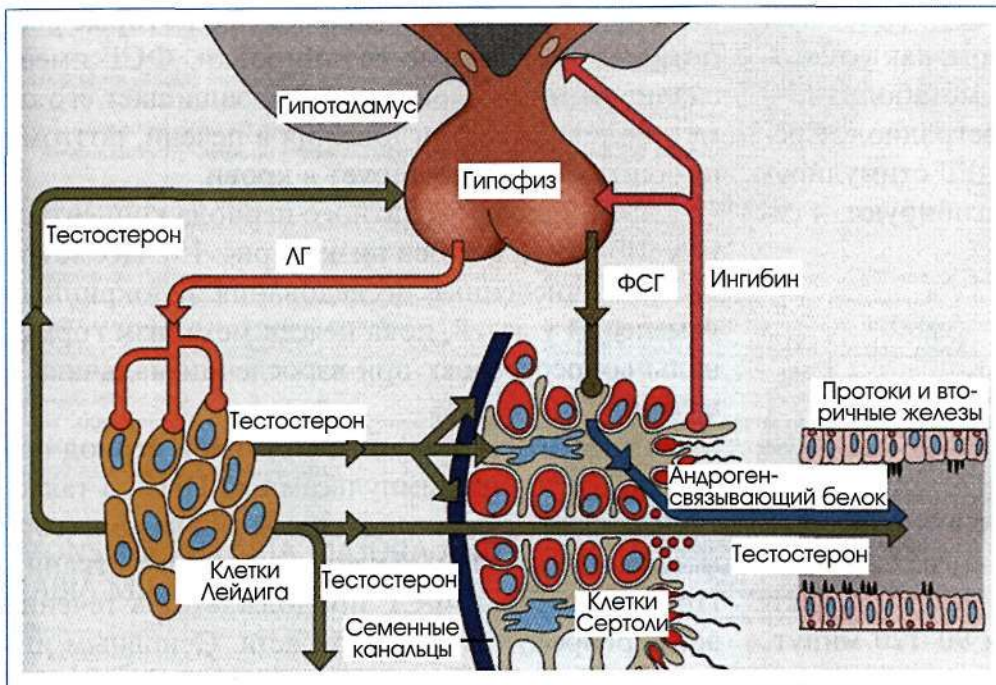


Рис. 16. Принцип регуляции гормонального статуса по механизму обратной связи. Процесс синтеза и секреции тестостерона регулируется гипоталамо-гипофизарно-гонадной системой. Падение концентрации свободного тестостерона в крови стимулирует увеличение синтеза и секреции ЛГ в ответ на стимуляцию ГнРГ. В свою очередь возросшее содержание ЛГ стимулирует продукцию и секрецию тестостерона клетками Лейдига

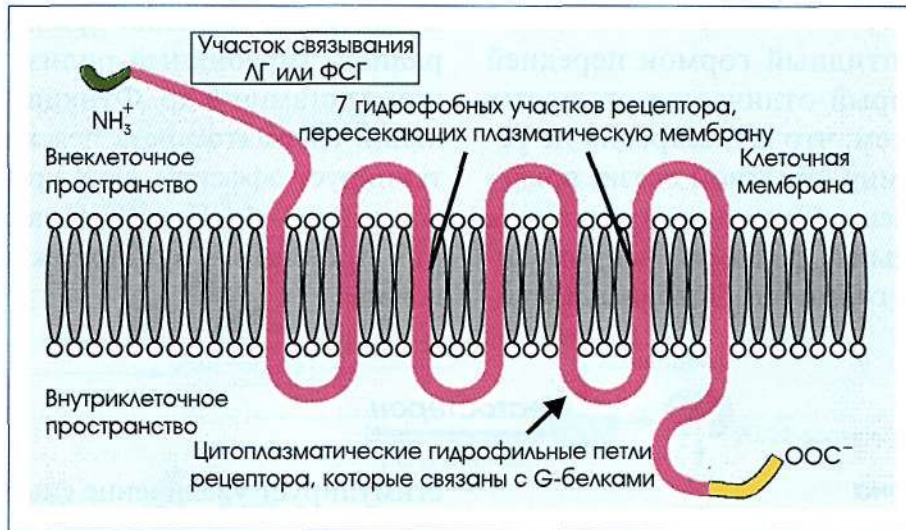


Рис. 17. Трансмембранные рецепторы для ЛГ и ФСГ – пептиды с 7 гидрофобными повторами, пересекающими 7 раз плазматическую мембрану. За счет нескольких петель рецептор приобретает многофункциональный характер. Внутриклеточный С-конец взаимодействует с цАМФ-зависимой протеинкиназой, гидрофильные петли рецептора активируют опосредуемые G-белками функциональные внутриклеточные перестройки. Со стороны N-конца свободная часть белковой молекулы рецепторов ЛГ и ФСГ разная, что определяет специфичность их эффектов. Каждый активированный рецептор приводит к образованию нескольких внутриклеточных мессенджеров активации в разных клетках. Для рецепторов ЛГ и ФСГ характерен очень большой свободный участок, непосредственно взаимодействующий с гормонами с высоким средством

аффинности связывания, поэтому методы иммунофлюоресценции часто бывают даже более чувствительными, чем РИА. Кроме того, иммунофлюоресцентные наборы характеризуются значительно большим сроком годности, чем РИА, в которых период полураспада для ^{125}I около 60 дней. Иммуноферментные тест-системы (ELISA) также выпускаются для определения ФСГ и ЛГ, но они менее чувствительны, чем РИА и иммунофлюоресцентные, так как в них используются макромолекулярные ферменты, сопряженные с антителами, которые часто имеют неспецифический компонент связывания. Для повышения специфичности ELISA применяются двухэтапные методы.

Особенностью измерения ЛГ служит то, что для обнаружения патологии наиболее чувствительным является измерение в сыворотке, взятой в ночное время (рис. 18). В ночной сыворотке изменения ЛГ определяются в случаях дефицита гонадотропина, тогда как в утренней и дневной сыворотке за счет циркадианных ритмов патология часто не проявляется. В то же время выявление изменений концентрации ЛГ никогда сразу не используется для клинической интерпретации гормональных нарушений, необходимо измерение

тестостерона при повышении ЛГ и функциональные тесты со стимуляцией ГнРГ освобождения ЛГ из гипофиза.

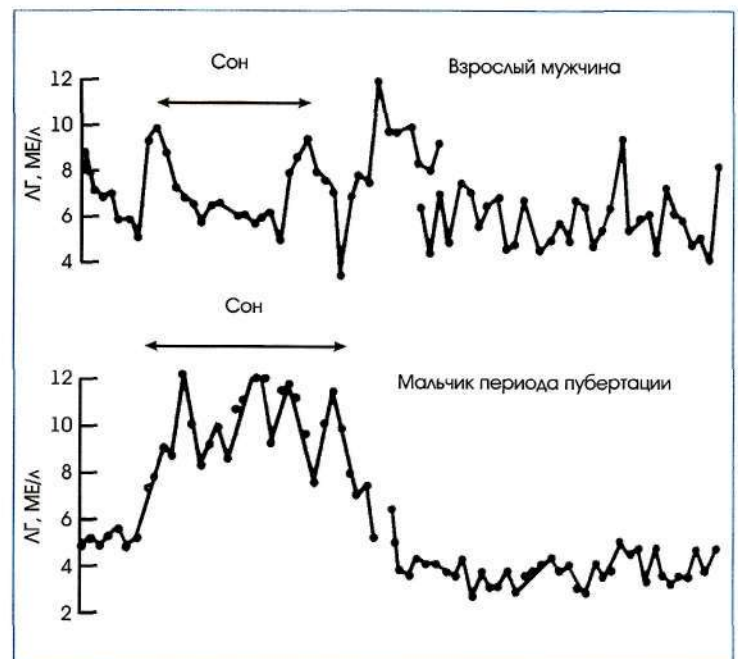


Рис. 18. Суточный ритм лутенизирующего гормона у 2 здоровых добровольцев, у которых кровь на исследование ЛГ брали через каждые 20 мин. У мальчика в период пубертата в ночное время резко увеличен уровень ЛГ

Пролактин

Пролактин – пептидный гормон передней доли гипофиза, который отличается от других гормонов гипофиза тем, что его секреция не регулируется по принципу обратной связи, вовлекающей органы-мишени. Секрецию пролактина контролируют локальные факторы, нейромедиаторы и стероидные гормоны. Основными сти-

муляторами секреции пролактина являются эстрадиол, тиреоидный релизинг-гормон, серотонин, гистамин и др. Функция пролактина в регуляции сперматогенеза неясна; возможно, он потенцирует эффекты двух других гонадотропных гормонов – ФСГ и ЛГ. Повышенная концентрация пролактина сопровождается дисфункцией гонад.

Тестостерон

Биосинтез тестостерона

Синтез тестостерона напрямую связан с периодами половой дифференцировки в неонатальный период, мужанием мальчиков и активностью мужской репродуктивной системы во взрослом состоянии (рис. 19).

Тестостерон в основном синтезируется клетками Лейдига путем последовательного превращения холестерина липопротеидов низкой плотности в прегненолон, дегидроэпиандростерон и андростендион (возможно его образование в жировой и других тканях путем взаимопревращения стероидных молекул) (рис. 20).

Процесс синтеза и секреции тестостерона регулируется гипоталамо-гипофизарно-гонадной системой по механизму обратной связи. Падение концентрации свободного тестостерона в крови



Рис. 19. Изменение уровня тестостерона в разные периоды жизни мужчины. В неонатальный период тестостерон определяет половую дифференцировку. С началом пубертатного периода начинают активно функционировать клетки Лейдига, вырабатывая тестостерон, что определяет выраженность вторичных мужских половых признаков

стимулирует увеличение синтеза и секреции ЛГ в ответ на стимуляцию ГнРГ. В свою очередь, возросшее содержание ЛГ стимулирует продукцию и секрецию тестостерона клетками Лейдига. Секретируемый клетками Лейдига тестостерон циркулирует в крови в свободной и связанной с белками формах, в основном с секс-гормон-связывающим глобулином (SHBG). До недавнего времени считалось, что только свободная фракция тестостерона биологически активна. Однако последние исследования доказали, что комплекс тестостерон–SHBG сам по себе способен связываться со специфическими мембранными рецепторами, вызывая активацию аденилатциклазы и приводя к синтезу цАМФ и транскриптной активности андрогеновых рецепторов. SHBG способен также связывать эстрадиол, поэтому его часто обозначают как тестостерон-эстрадиол-связывающий глобулин (ТЭСГ). SHBG синтезируется в печени, причем эстрадиол стимулирует продукцию этого белка. У здоровых мужчин повышение в плазме SHBG приводит к быстрому снижению тестостерона и одновременной стимуляции синтеза тестостерона, что нормализует уровень гормона. При мужском гипогонадизме концентрация SHBG может быть повышена.

Большая часть образованного тестостерона секретируется в семенные протоки, где он соединяется с андроген-связывающим белком (АСБ), вырабатываемым клетками Сертоли. Это депо связанного с белком тестостерона обеспечивает высокую локальную концентрацию андрогена, необходимую для нормального сперматогенеза. Проникнув в клетку органа-мишени, тестостерон трансформируется в свои активные производные, способные обеспечивать на клеточном уровне биологическое действие этого гормона.

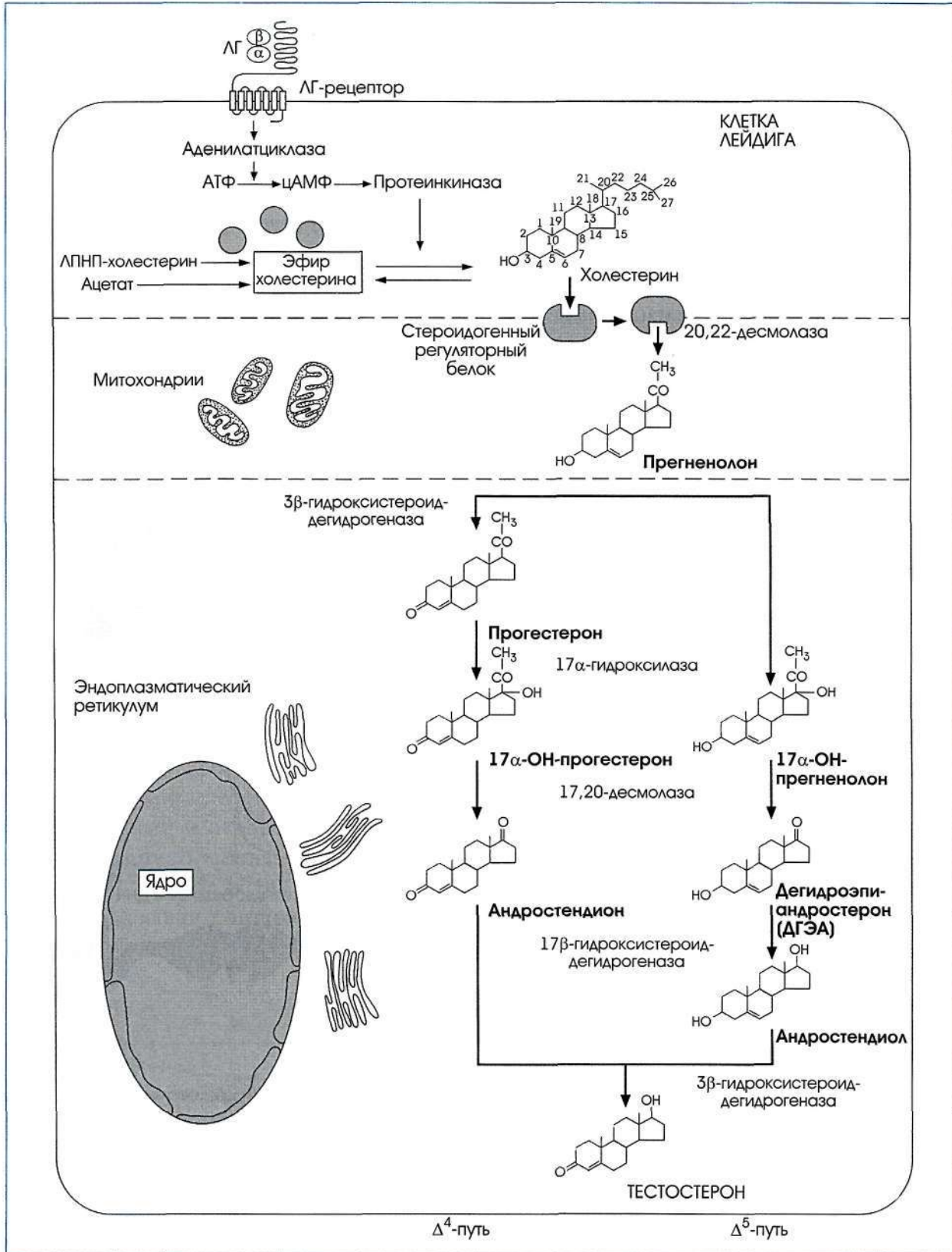


Рис. 20. Биосинтез стероидов в клетках Лейдига. Синтез активируется ЛГ через специфический рецептор, что сопровождается активацией аденилатциклазы и протеинкиназы, усиливающих образование свободного холестерина в клетке. Ключевую роль в синтезе стероидов играет стероидогенный регуляторный белок (StAR), локализованный на внутренней мембране митохондрий и обеспечивающий перенос холестерина. При мутации гена синтеза StAR и неспособности вырабатывать этот белок развивается врожденная гиперплазия надпочечников и не образуется достаточное количество стероидных гормонов. Тестостерон – основной стероидный гормон яичек, хотя одновременно образуются также андростерон, андростендион, 17-гидроксипрогестерон и 5α-дигидротестостерон (ДТГ). Функция андростерона, андростендиона и 17-гидроксипрогестерона неясна, а ДТГ необходим для функционирования добавочных половых желез

Механизм действия тестостерона на клетки-мишени

Основным путем метаболизма тестостерона является образование более активного андрогена – 5 α -дигидротестостерона (ДГТ) под влиянием ароматаз – формирование эстрадиола с полной утратой специфического действия и приобретением новых свойств. Восстановление тестостерона до ДГТ происходит на уровне эндоплазматического ретикулума с участием фермента 5 α -редуктазы, которая имеет две изоформы. Тип I 5 α -редуктазы максимально активен в щелочной среде и присутствует в клетках кожи, печени и мозга. Тип II 5 α -редуктазы функционирует в кислой среде и активен в половых органах – придатке яичка и предстательной железе. Изменение свойств типа II 5 α -редуктазы из-за генных мутаций может приводить к псевдогермафродитизму. ДГТ инактивируется путем восстановления до 17-кетостероидов, которые экскретируются с мочой. Продукты дальнейшего превращения дигидротестостерона значительно менее активны, чем тестостерон и дигидротестостерон. Некоторые метаболиты андрогенов выделяются в свободном виде, а часть перед экскрецией подвергается конъюгации с гиалуроновой кислотой в печени. Высокая активность ферментов стероидного метаболизма в печени приводит к достаточно короткому периоду циркуляции гормонов в кровотоке независимо от связывания с белками (время полувыведения тестостерона из плазмы крови составляет 12 мин).

Образовавшийся в клетках-мишенях ДГТ взаимодействует со специфическими цитоплазматическими рецепторами, число которых в пределах одной клетки может достигать 100 000. Структурная организация рецепторов представлена на рис. 21. В результате взаимодействия рецепторов и ДГТ формируется андроген-рецепторный комплекс, который проникает в ядро клетки, соединяется со специфическими участками ДНК и изменяет активность определенных генов.

Концентрация ДГТ в системном кровотоке здоровых мужчин составляет примерно 10% от концентрации тестостерона. Из циркулирующего ДГТ примерно 25% секретируется яичками, остальная часть образуется в результате метаболизма тестостерона в печени, почках, мышцах, простатической железе и коже. Концентрация

ДГТ в простате в 5–10 раз выше по сравнению с системной кровью. В отличие от тестостерона ДГТ не уменьшается у стариков. Так как концентрация ДГТ нормальна при тестикулярной недостаточности, то исследование ДГТ, как правило, не проводится с диагностическими целями в КДЛ. Кроме того, антитела против ДГТ дают перекрестные реакции с тестостероном, поэтому очень сложно различить эти 2 стероидных гормона.

Основным органом метаболической инактивации тестостерона является печень, поэтому метаболизм тестостерона во многом зависит от функционального состояния этого органа. Различные

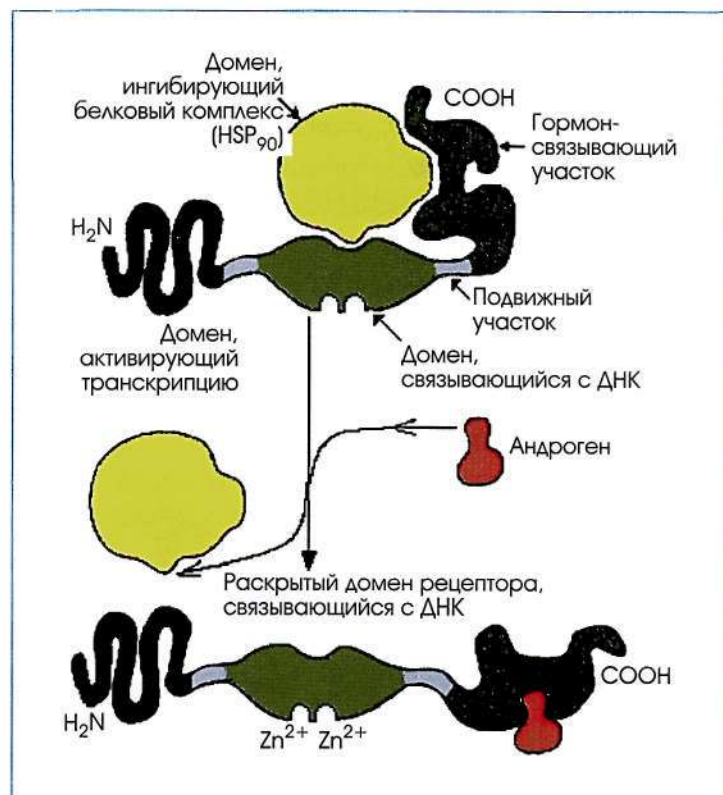


Рис. 21. Модель внутриклеточного андрогенового рецептора, с которым взаимодействуют тестостерон и его производные. После связывания гормона меняется конфигурация белкового рецептора, из комплекса освобождается ингибиторный белок (Heatshock protein, HSP₉₀) и раскрывается домен, взаимодействующий с ДНК. В результате активируется синтез РНК и специфических белков, определяющих биологические эффекты андрогенов. В ДНК-связывающем домене присутствуют два цинк-связывающих кармана, состоящих примерно из 70 аминокислотных остатков. Ионы Zn²⁺ необходимы для взаимодействия рецептора с ДНК. ДГТ связывается с рецептором с большей аффинностью, чем тестостерон. Другие стероидные гормоны, такие, как эстрадиол, андростендион и прогестерон, связываются с рецептором с меньшей, чем у тестостерона, аффинностью

поражения печени приводят к ферментопатиям, в результате значительная часть андрогенов не инактивируется, а преобразуется в эстрогены: тестостерон превращается в эстрадиол, а андростендион – в эстрон. Возникающая гиперэстрогемия приводит к нарушению генеративной и копулятивной функций. Способностью андрогенов трансформироваться в эстрогены во многом объясняется возникновение гинекомастии у лиц с циррозом печени или иного вида печеночной недостаточностью.

Значение и действие тестостерона в организме мужчины весьма существенны и разнообразны. Его влияние осуществляется с раннего внутриутробного периода и продолжается всю последующую жизнь. Тестостерон оказывает действие на андроген-чувствительные клетки, вызывая различные эффекты, интенсивность которых обусловлена количеством специфических рецепторов (рис. 22). Рецепторы к тестостерону имеются на клетках Лейдига, Сертоли и перитубулярных клетках. В перитубулярных клетках тестостерон стимулирует синтез сократительного белка актина и образование перитубулярной модифицирующей субстанции (PmodS – peritubular modifying substance), которая влияет на образование секрета клетками Сертоли, а также определяет взаимодействие стромы с эпителиальными клетками и оказывает влияние на предстательную железу. В клетках сперматогенеза андрогеновые рецепторы не экспрессированы.

Андрогены оказывают положительный эффект на стабильность андрогеновых рецепторов

в клетках. Уменьшение концентрации андрогенов приводит к деградации рецепторов. Количество андрогеновых рецепторов снижается с возрастом, зависит от ткани и клеточной популяции. Дефекты андрогенового рецептора, возникающие в результате делеции или инактивации гена андрогенового рецептора, способствуют изменению функции рецептора, и, как следствие, возникает недоразвитие яичек. Полное исчезновение андрогенового рецептора приводит к развитию женского фенотипа с отсутствием любых проявлений мужской сексуальности.

Биологические эффекты тестостерона

Основными биологическими эффектами тестостерона являются:

- стимулирующее влияние на половые органы;
- стимулирующее влияние на добавочные половые железы (предстательная железа, семенные пузырьки);
- активация сперматогенеза;
- маскулинизирующее воздействие на развитие и выраженность вторичных половых признаков (строение скелета, состояние мышечной и костной систем, характер оволосения, голосовой аппарат, кожный покров);
- активация метаболических процессов (влияние на обмен жиров, белков, углеводов, микроэлементов, а также эритропоэз).

Действие тестостерона и его метаболитов на развитие репродуктивной системы и вторичные

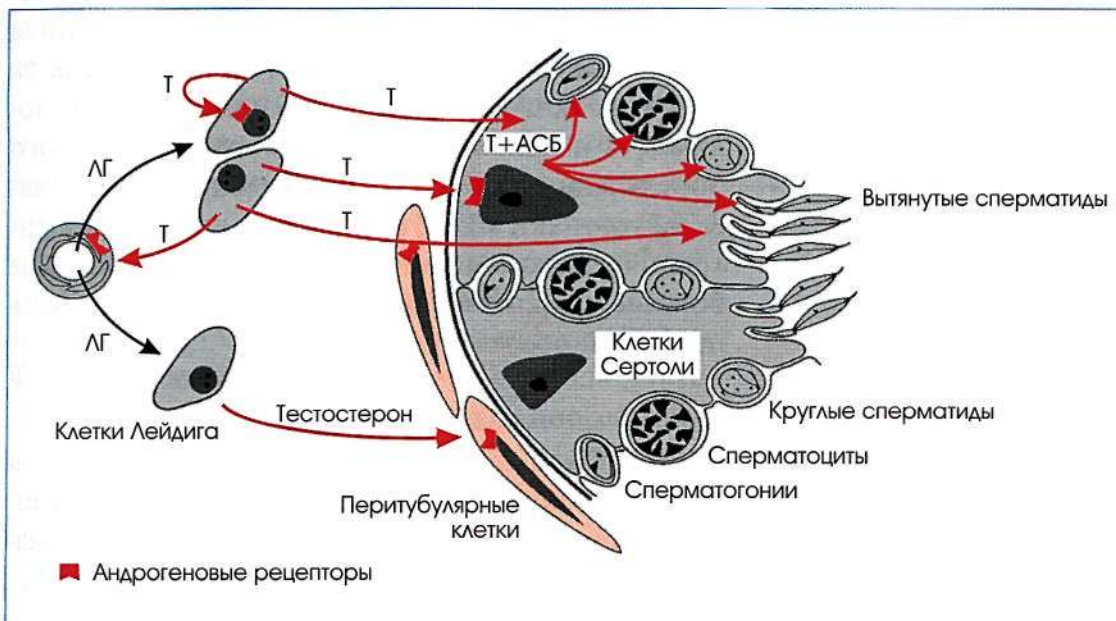


Рис. 22. Эффекты тестостерона в яичках. Тестостерон синтезируется в клетках Лейдига под влиянием ЛГ. Рецепторы к тестостерону имеются на клетках Лейдига, перитубулярных клетках и клетках Сертоли. Тестостерон влияет на межклеточные взаимодействия (клетки Сертоли – сперматиды)

половые признаки классифицируется как андрогенное, а эффекты на соматические ткани – как анаболическое.

Андрогены играют важную роль в разные периоды жизни человека. В эмбриональный период тестостерон определяет дифференцировку половых органов, в период полового созревания – развитие фенотипа взрослого мужчины, а затем поддерживает анаболические функции.

В начале пубертатного периода тестостерон ускоряет рост трубчатых костей, когда же его уровень резко возрастает, наступает окостенение диа- и эпифизарных хрящей и остановка роста. Тестостерон поддерживает нормальный минеральный состав костной ткани. Однако действие андрогенов на костную ткань, по-видимому, опосредовано через эстрадиол. Отсутствие этих стероидов ведет к остеопорозу. Тестостерон оказывает прямой анаболический эффект как на гладкие, так и на поперечно-полосатые мышцы, увеличивая мышечную массу за счет гипертрофии миофибрилл. Отсутствие тестостерона ведет к атрофии мышц. Эффекты андрогенов на кожные покровы и оволосение по мужскому типу опосредованы через тестостерон и ДГТ.

Влияние тестостерона на эритропоэз обусловлено усилением продукции эритропоэтина в почках и соответственно стимуляцией клеток красного ростка в костном мозге. Поэтому более высокие нормальные показатели количества эритроцитов и концентрации гемоглобина у мужчин объясняются стимулирующим эффектом андрогенов на эритропоэз. Кроме того, тестостерон способен активировать экспрессию тромбоксановых рецепторов на тромбоцитах, вызывая усиление их агрегации, что можно рассматривать как повышенную предрасположенность к тромбозам.

Становление и поддержание полового влечения обеспечивается нейроэндокринными механизмами, центральное место среди которых занимают андрогены.

Методические аспекты определения тестостерона

Общий тестостерон

Общий тестостерон можно измерить в сыворотке прямыми методами иммунохимии или после экстракции с органическими растворителями

с или без последующего хроматографического разделения. Коммерческие РИА-наборы для прямого измерения тестостерона не требуют экстракции, в качестве радиоактивной метки используют ^{125}I , технически легки в исполнении и обладают достаточными точностными характеристиками (правильность и воспроизводимость) для большинства клинических задач. Однако в случае низкого уровня SHBG результаты РИА-определения тестостерона могут быть завышенными, и, наоборот, при высоком уровне SHBG определение тестостерона занижено. Этот результат возникает из-за разной концентрации SHBG в используемых для анализа стандартах и в пробе и разного связывания немеченного тестостерона с SHBG и антителами сыворотки, в которой меченный ^{125}I -тестостерон первично связан с антителами. Прямые наборы также, как правило, завышают результаты при низкой концентрации тестостерона.

Более правильные результаты при низкой концентрации тестостерона и выраженных колебаниях SHBG дают методики с экстракцией гормона органическими растворителями и хроматографическим их разделением. Однако эти методы дорогостоящие и трудоемкие для выполнения в клинико-диагностических лабораториях.

В настоящее время для клинического использования разработаны полностью автоматизированные двухэтапные методы иммунохимического определения половых гормонов. Это хемилюминесцентный иммуноанализ, использующий нерадиоактивную метку и характеризующийся очень быстрым выполнением исследования за счет короткого времени инкубации. Воспроизводимость и правильность хемилюминесцентного определения тестостерона в большинстве случаев не уступают РИА, однако при низких концентрациях тестостерона результат может быть еще больше завышен. Липемия также может быть причиной ложных результатов.

Свободный тестостерон

Свободный тестостерон определяется как процент общего тестостерона на основании проведения равновесного диализа. В этом случае измеряется радиоактивность ^3H -меченного тестостерона, добавленного к пробе, после диффузии

его через полупроницаемую диализную мембрану. Свободная фракция составляет 1–4% общего тестостерона, что соответствует 4–20 нг/100 мл сыворотки. Этот многоэтапный анализ потенциально может иметь несколько погрешностей, вызванных нарушением температуры, неправильным дозированием и низким уровнем сигнала. Иногда ^3H -меченный тестостерон измеряют прямо в диализате, но в этом случае необходимо использовать очень чувствительную аппаратуру. Центрифужная ультрафильтрация – разновидность метода равновесного диализа, в котором используется ультрацентрифугирование для разделения через полупроницаемую мембрану свободного тестостерона от связанного.

В настоящее время разработаны и широко используются в диагностических целях наборы для определения свободного тестостерона методом РИА, в которых прямо измеряют свободный ^{125}I -меченный тестостерон. В этих тестах применяется антисыворотка непосредственно против тестостерона, а не против SHBG, тест высокопроизводительный, одноэтапный, без экстракции. Несмотря на то что этот метод хорошо коррелирует с методом равновесного диализа, тем не менее получаемые результаты свободного тестостерона занижены примерно на 25%. Кроме того, при измерении этим способом свободный тестостерон не снижается при увеличении SHBG, т. е. свободный тестостерон практически воспроизводит те же изменения, что и общий тестостерон, поэтому при таком способе измерения свободного тестостерона не выявляется дополнительной клинической информации по сравнению с определением общего тестостерона.

Расчетный свободный тестостерон. Одним из подходов для коррекции при вариантах с разной концентрацией SHBG является расчет свободного тестостерона из уровня общего тестостерона и SHBG с использованием константы связывания тестостерона для SHBG и альбумина (Sodergard et al. // J. Steroid Biochem 1982; 16: 810). Иногда вычисляют индекс свободного тестостерона как отношение общего тестостерона к SHBG, выраженному в нмоль/л. Несмотря на то что этот индекс легко вычисляется, однако его можно использовать только у мужчин, так как у

женщин SHBG является транспортным белком для эстрогенов.

Биодоступный тестостерон

Биодоступный тестостерон, или тестостерон, не связанный с SHBG, – это в основном тестостерон, соединенный с альбумином, который характеризуется низкой аффинностью. Согласно представлениям о биодоступности тестостерон из комплекса с альбумином легко диссоциирует в органах-мишенях и тем самым доступен для осуществления биологических эффектов. Для определения биодоступного тестостерона используется метод преципитации ^3H -тестостерона, связанного с SHBG, сульфатом аммония. Тестостерон, не связанный с SHBG (биодоступный тестостерон), рассчитывается путем вычитания из общего тестостерона количества тестостерона, оставшегося в супернатанте после осаждения преципитатов, сформировавшихся на сульфате аммония. Биодоступный тестостерон тесно коррелирует в широком диапазоне концентраций со свободным тестостероном (рис. 23). Этот факт можно рассматривать как доказательство, что данный показатель дает возможность получить достаточно полезную клиническую информацию.

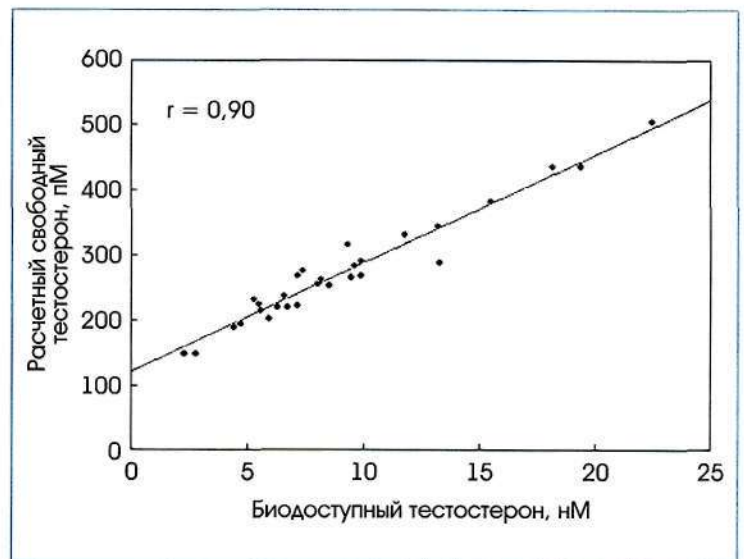


Рис. 23. Соотношение между свободным тестостероном, содержание которого рассчитано, исходя из определения уровня общего тестостерона и SHBG, и биодоступным тестостероном, т. е. не связанным с SHBG, у мужчин с нормальной массой тела и мужчин с ожирением

Эстрогены

Значение эстрогенов в мужском организме изучено недостаточно. Известно, что около 70% эстрогенов образуется преимущественно в печени и жировой ткани в результате периферической ароматизации тестостерона в эстрадиол и андростендиона в эстрон, а остальные 30% синтезируются яичками и надпочечниками. Поэтому в сыворотке мужчин циркулируют как андрогены, так и эстрогены. В норме концентрация общего эстрадиола <50 пг/мл, а общего эстрона – <60 пг/мл. Концентрация сывороточного эстрадиола у мужчин практически постоянна в течение суток и не меняется с возрастом. Эстрогены в плазме связаны в основном с альбумином, сродство эстрадиола с SHBG составляет примерно 10% от сродства тестостерона с SHBG, поэтому изменения SHBG мало влияют на содержание эстрогенов в плазме.

Ароматизация тестостерона до эстрогенов играет важную роль в развитии предстательной железы. Концентрация эстрогенов в стромальной ткани предстательной железы повышается при ее гиперплазии. Определение в сыворотке эстрогенов может быть полезным для клинической оценки мужского гипогонадизма и гинекомастии. В табл. 2 представлены заболевания, которые могут сопровождаться повышением эстрогенов в сыворотке, наиболее частой причиной этого является ожирение. Похудание сопровождается снижением концентрации эстрогенов.

Таблица 2

Заболевания, которые могут сопровождаться повышением эстрогенов в сыворотке мужчин

Опухоли
Опухоли яичек из клеток Лейдига и клеток Сертоли
Аденома и карцинома надпочечников
Хорионкарцинома
Гепатома
Первичная тестикулярная недостаточность
Алкогольный цирроз печени
Гипертиреоз
Ожирение
Наследственная избыточная активность ароматаз
Неадекватное использование лекарственных препаратов
Антиандрогенов
Антиэстрогенов

Для определения эстрогенов в сыворотке выпускаются тест-наборы, но они предназначены в первую очередь для использования у женщин, уровень эстрогенов у которых значительно выше, чем у мужчин. Поэтому эти тест-наборы дают относительно высокую погрешность при определении концентрации эстрогенов у мужчин, в связи с чем рекомендуется при низких концентрациях эстрогенов делать предварительную экстракцию эстрогенов органическими растворителями, в некоторых случаях даже хроматографическое разделение интерферирующих стероидов, а затем уже иммуноанализ.

Гормоны роста

Гормоны роста связываются с поверхностными рецепторами клеток и вызывают их специфическую дифференцировку. Основными факторами роста в локальной регуляции сперматогенеза являются трансформирующий фактор роста (TGF- α и TGF- β), ингибин и активин, фактор роста нервов (NGF), инсулиноподобный фактор роста I (IGF-I) и эпидермальный фактор роста (EGF).

Ингибин и активин

Ингибин и активин синтезируются клетках Сертоли и Лейдига. Это структурно связанные белки,

отличающиеся составом субъединиц (рис. 24). Ингибин состоит из 2 α -субъединиц (ингибин А) или из α -субъединицы и одной из β А- или β В-субъединиц (ингибин В, гетеродимер), тогда как активин – из β А β А, β А β В или β В β В (гомодимер). Субъединицы соединены между собой дисульфидными мостиками. Мономерные формы α -субъединицы обнаружены в системе циркуляции в молярных концентрациях, превышающих димерные формы, однако биологической активностью обладают только димеры.

Активин стимулирует пролиферацию клеток сперматогенеза, а ингибин ее подавляет через со-

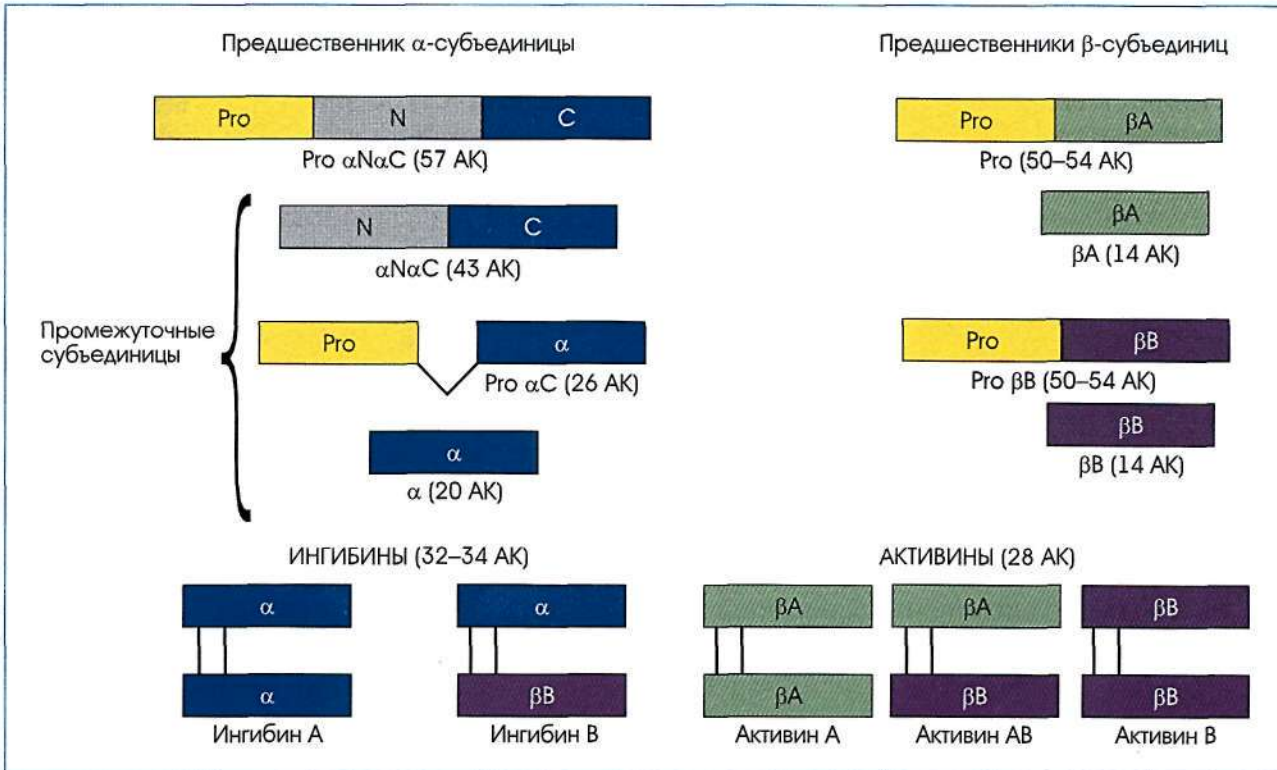


Рис. 24. Молекулярные формы активинов и ингибинов

ответственно положительную или отрицательную обратную связь, влияя на выработку ФСГ гипофизом. Активин в сыворотке крови обладает высоким сродством к фоллистатину. Активин и ингибин обратимо связаны с α_2 -макроглобулином, что, по-видимому, имеет значение для регуляции их активности в кровотоке. У мужчин клетками Сертоли преимущественно синтезируется ингибин В, который является основным фактором, обеспечивающим функционирование отрицательной обратной связи на секрецию ФСГ гипофизом. Между ингибином В и ФСГ имеются реципрокные отношения: если один из них повышается, то другой снижается. У здоровых мужчин концентрация ингибина В, как правило, <480 пг/мл.

Для определения ингибина А и ингибина В имеются коммерческие двухэтапные ELISA-тесты. С их помощью показано, что в препубертатный период у мальчиков и при дефиците гонадотропинов у мужчин уровень ингибина В низкий. Клинические исследования показали, что концентрация ингибина в сыворотке крови коррелирует с активностью сперматогенеза и размерами яичек. Определение концентрации ингибина В используется в качестве показателя локальных де-

фектов сперматогенеза (рис. 25) и является маркером функциональной активности клеток Сертоли. Концентрация ингибина в сыворотке крови мужчин с нормальным содержанием сперматозоидов в эякуляте в два раза превышает этот

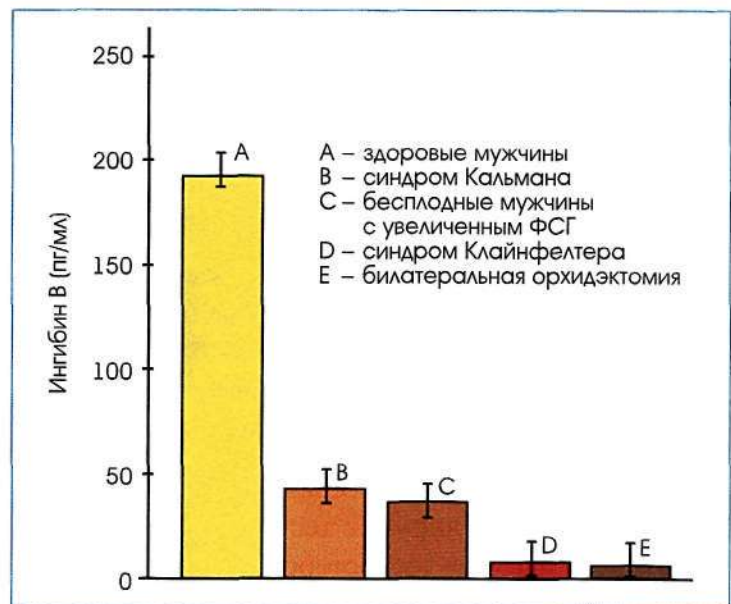


Рис. 25. Уровень ингибина В у здоровых мужчин и мужчин с различными нарушениями гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси. Адаптированные данные из: Anelwalt et al. // JCEM 1996; 81: 3341–3345

показатель у мужчин с олигозооспермией. У мужчин, прошедших лечение по поводу варикоцеле, уровень ингибина в сыворотке крови повышается на 25%, что сопровождается увеличением количества сперматозоидов и их подвижности в эякуляте. При этом концентрация ФСГ, ЛГ и тестостерона существенно не изменяется. После облечения тестикул или химиотерапии при опухолях уровень ингибина В в сыворотке очень низкий в течение нескольких месяцев, что свидетельствует об ингибировании сперматогенеза в этот период.

Наиболее значимым определением ингибина В является у мужчин, которым необходимо провести дифференциальную диагностику между обструктивной олигоспермией и олигоспермией из-за гормональных сдвигов. В случае обструктивной олигоспермии концентрация ингибина В в системе циркуляции достаточно высокая, если же имеет место эндокринная недостаточность и подавлен сперматогенез, то концентрация ингибина В в системном кровотоке низкая. Этот показатель активно исследуется в связи с проведением экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Если имеет место обструктивная олигоспермия, то возможно проведение экстракции спермы хирургически прямо из эпидидимиса или яичек, в

случае гормональных нарушений такая хирургическая экстракция спермы малоэффективна.

Клиническое значение определения ингибина А пока не вполне ясно, так как даже при опухолях, продуцирующих α -субъединицы, уровень ингибина А в сыворотке не повышается.

Инсулиноподобный фактор роста I (IGF-I) и трансформирующий фактор роста (TGF- α)

IGF-I и TGF- α стимулируют активность сперматогенеза, тогда как TGF- β действует как ингибитор. IGF-I экспрессируется на сперматоцитах и стимулирует в них синтез ДНК и митотическое деление. EGF стимулирует активность клеток Лейдига и непосредственно усиливает сперматогенез. NGF – важный фактор, участвующий в мейотическом делении сперматоцитов.

Таким образом, сперматогенез – длительный и сложный процесс, в результате которого образуются морфологически нормальные сперматозоиды, способные к оплодотворению яйцеклетки. Процесс сперматогенеза регулируется осью гипоталамус–гипофиз, которая вместе с яичком образует саморегулирующую систему с отрицательными обратными связями. Нарушение процесса сперматогенеза приводит к развитию патоспермии.

Белки, связывающие гормоны

Тестостерон-эстрадиол-связывающий глобулин (ТЭСГ; или секс-гормон-связывающий глобулин, SHBG; или половые стероиды связывающий глобулин, ПССГ)

Циркулирующий тестостерон у здоровых мужчин в большей части связан с белками: 1–2% – с кортизол-связывающим глобулином, примерно 50% – с альбумином, 45% – с высоким сродством с SHBG; только <4% тестостерона присутствует в плазме в свободном виде (рис. 26). SHBG синтезируется печенью. У здоровых мужчин уровень SHBG тесно коррелирует с тестостероном. Известно, что связывание тестостерона SHBG защищает его в системе циркуляции от протеолитической деградации, тем не менее не все ясно с ролью SHBG в реализации андрогенной функции мужчин. Для SHBG на мембранах клеток яичка, простаты и других тканей обнаружены места связывания, ко-

торые вызывают активацию внутриклеточной системы цАМФ – протеинкиназа. Из этого следует, что SHBG оказывает прямой андрогенный эффект. В то же время широко распространено представление, что биологический эффект вызывает только свободная фракция тестостерона, а SHBG-связанный тестостерон является лишь резервуаром для формирования свободной фракции.

Во многих клинических исследованиях показано, что для оценки андрогенной функции достаточно определения общего тестостерона. Однако изменения циркулирующего SHBG (табл. 3) могут влиять на уровень общего тестостерона. Например, низкий уровень общего тестостерона при ожирении некоторыми трактуется как доказательство андрогенной недостаточности. В то же время биодоступный тестостерон в этих случаях может быть нормальным (рис. 26). Поэтому име-

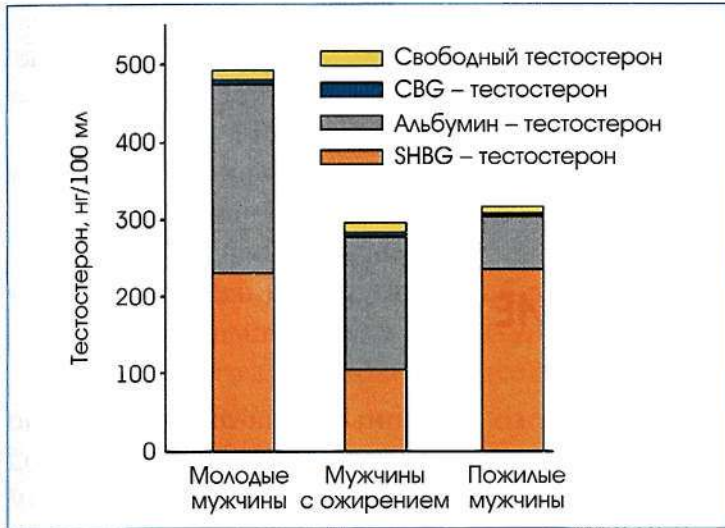


Рис. 26. Распределение тестостерона в плазме крови. Свободная фракция составляет 1–4% общего тестостерона (Т). Альбумин связывает с низким сродством примерно 50% Т. Свободная фракция Т и связанная с альбумином обозначаются как биодоступные. 1–2% Т объединено с кортизол-связывающим глобулином (СВГ), примерно 45% – с высоким сродством с тестостерон-эстрадиол-связывающим глобулином (SHBG), его роль в реализации андрогенной функции остается противоречивой. При снижении SHBG при ожирении общий Т уменьшается, а биоактивный остается нормальным. У пожилых, несмотря на уменьшение общего Т, уровень SHBG соответствует таковому у молодых мужчин, поэтому общий Т снижен существенно меньше, чем биодоступный Т

ются тест-наборы для определения как общего, так и свободного тестостерона и для определения SHBG в плазме крови.

Таблица 3

Состояния, сопровождающиеся изменением концентрации SHBG в плазме крови

Повышение	Снижение
Возраст	Гиперинсулинемия
Дефицит андрогенов	Ожирение
Прием эстрогенов	Лечение андрогенами
Тиреотоксикоз	Гипотиреоз
Алкогольный цирроз	Нефротический синдром
Гепатит	Акромегалия
Дефицит гормона роста	Врожденный дефицит

SHBG возможно определить с использованием коммерческих иммунорадиоактивных двух-этапных тестов, в которых используются кроличьи или мышинные антитела. Нормальный диапазон для мужчин 10–50 нмоль/л, для детей – 45–90 нмоль/л, для женщин – 30–90 нмоль/л. Измерение SHBG полезно не только для интерпретации данных по тестостерону, но и как маркер инсулиновой резистентности и фактор риска сердечно-сосудистой патологии.

Андроген-связывающий белок

Андроген-связывающий белок (АСБ), продуцируемый клетками Сертоли, по структуре белковой части схож с SHBG, однако у них разные углеводные компоненты.

МУЖСКОЕ БЕСПЛОДИЕ

Согласно определению ВОЗ, **бесплодие** – это отсутствие беременности при регулярной половой жизни без предохранения в течение, по крайней мере, 12 месяцев. *Первичное мужское бесплодие* – это состояние, когда от данного мужчины никогда не наступало зачатия. *Вторичное беспло-*

дие: от данного мужчины когда-либо наступало зачатие, независимо от того, каков был исход беременности (ВОЗ, 1997 г.). При вторичном бесплодии прогноз более оптимистичен, особенно если период, в течение которого беременность не наступала, не превышает 3 лет.

Классификация и причины бесплодия у мужчин

В России наиболее распространена следующая классификация мужского бесплодия (по О.Л. Тиктинскому):

I. Секреторное бесплодие:

- 1) первичная недостаточность яичек (вследствие поражения самих яичек врожденного или приобретенного генеза);
- 2) вторичная недостаточность яичек:
 - а) центрального происхождения (поражение гипоталамо-гипофизарной области и других отделов ЦНС);
 - б) дискорреляционная недостаточность яичек (вследствие нарушения функции эндокринных желез и других внутренних органов).

II. Экскреторное бесплодие:

- 1) заболевания и пороки развития мочеиспускательного канала и добавочных половых желез;
- 2) экскреторно-обтурационное бесплодие (вследствие врожденной или приобретенной обструкции семявыносящих путей).

III. Иммунное бесплодие.

IV. *Сочетанное бесплодие* (секреторная недостаточность половых желез в сочетании с воспалительными, обструктивными и иммунными процессами).

V. *Относительное бесплодие* (отсутствие причин, вызывающих бесплодие).

Основными причинами мужского бесплодия являются:

- варикоцеле;
- инфекционно-воспалительные заболевания половых органов;
- патозооспермия неустановленной этиологии;
- изолированные патологические изменения семенной жидкости;
- иммунологические нарушения;
- врожденные аномалии (крипторхизм, монорхизм, гипоспадия, эписпадия и т. д.);
- системные заболевания (туберкулез, сахарный диабет, заболевания щитовидной железы, хронические заболевания органов дыхания, цирроз печени, эпидемический паротит, осложненный орхитом и др.);
- хирургические вмешательства по поводу паховой грыжи, гидроцеле, стриктуры уретры, операции на мочевом пузыре и др.;
- лучевая, гормональная терапия, химиотерапия, применение некоторых психотропных, гипотензивных средств, антибиотиков, препаратов нитрофуранового ряда;
- сексуально-эякуляторные нарушения;
- обструктивная азооспермия;
- некрозооспермия;
- эндокринные заболевания и расстройства (гипогонадизм, гиперпролактинемия, тестостерондефицитные состояния).

К дополнительным причинам мужского бесплодия относятся:

- привычные интоксикации (злоупотребление алкоголем и никотином);
- профессиональные вредности (воздействие ионизирующей радиации, контакт с органическими и неорганическими веществами);
- тепловой фактор (длительный период лихорадки с повышением температуры тела выше 38 °С, работа в условиях высоких и низких температур);
- травмы мошонки;
- психологические травмы;
- алиментарный фактор.

Высокая частота и разнообразие причин мужского бесплодия требуют тщательного сбора анамнеза, клинического обследования и проведения лабораторных исследований.

Доказано, что на фертильность влияют такие системные заболевания, как сахарный диабет и нервно-психические заболевания, приводящие к импотенции и нарушениям эякуляции, туберкулез, вызывающий эпидидимит и простатит, хронические заболевания респираторного тракта. В этом случае наблюдается неподвижность сперматозоидов, вызванная патологией жгутика и/или нарушением пассажа спермы через придаток. Аналогичные нарушения подвижности могут быть ассоциированы с цистофибро-

зом поджелудочной железы. Известна связь бесплодия с вирусным эпидемическим паротитом, осложненным орхитом, если заболевание произошло в период полового созревания. Следует обращать внимание на оперативные вмешательства, произведенные на мочевом пузыре и по поводу варикоцеле, крипторхизма, паховой грыжи, гидроцеле, стриктуры уретры, симпатэктомии, которые могут приводить к ретроградной эякуляции или экскреторной азооспермии, осложненной выработкой антиспермальных антител. Любая операция, особенно с применением общего наркоза, может приводить к временному нарушению фертильности. Особого внимания заслуживают инфекции, передаваемые половым путем, последствием которых может быть обструктивная азооспермия, образование антиспермальных антител, эякуляторные нарушения. Необходимо выяснять у пациента, не было ли перекрута или травм яичка, особенно если это сопровождалось гематомой мошонки, гемоспермией или гематурией.

Патогенез бесплодия у мужчин крайне сложен из-за того, что в патологический процесс вовлекаются не только центральная нервная система, гонады, периферические органы-мишени, но и другие эндокринные железы (щитовидная, надпочечники), иммунная, симпатoadrenalовая и другие системы. Рассмотрим основные факторы бесплодия, выделив несколько групп.

Варикоцеле

Варикоцеле – расширение вен семенного канатика, обнаруживается примерно у 12–39% пациентов, обратившихся по поводу бесплодия, и служит второй по частоте встречаемости причиной бесплодия. Выявление варикоцеле в подростковом возрасте – одно из основных направлений профилактики бесплодия. Обычно варикоцеле не проявляется до наступления пубертата. Варикоцеле в 95% случаев бывает левосторонним, что связано с особенностями регионального кровообращения: отток крови из лозовидного сплетения левого яичка происходит по внутренней яичковой вене, впадающей в левую почечную вену под прямым углом, в то время как правая впадает в нижнюю полую вену под острым углом. Ког-

да внутренняя яичковая вена пережимается опухолью (обычно опухолью почки), говорят о вторичном варикоцеле. К факторам, отрицательно влияющим на сперматогенез при варикоцеле, относят: 1) высокую температуру в мошонке; 2) замедление кровотока и нарушение трофики тканей; 3) лимфостаз в яичке на стороне поражения; 4) нарушение гематотестикулярного барьера; 5) развитие аутоиммунного процесса. В этих условиях происходит снижение концентрации и подвижности сперматозоидов, одновременно уменьшается число клеток Лейдига и их способность отвечать на стимуляцию ЛГ. Основным методом лечения варикоцеле – хирургический, позволяющий прекратить ретроградный заброс крови из почечной

вены. По данным многоцентрового исследования ВОЗ (1997), чем раньше выполнена операция, тем быстрее происходит восстановление фертильности. Неблагоприятными прогностическими факторами, при которых маловероятно восстановление фертильности, являются возраст свыше 30 лет, более чем 3 года диагностируемая па-

тоспермия, двусторонний процесс и гипоплазия яичек. Бесплодие, вызванное варикоцеле, проявляется в виде олиго-, астено-, тератозооспермии или их комбинации. Варикоцеле может быть ассоциировано со снижением ФСГ, что рассматривается как плохой прогностический признак.

Экскреторное бесплодие

Двухсторонняя непроходимость семявыносящих путей выявляется более чем у 8% мужчин, обращающихся по поводу лечения бесплодия. Встречаются различные аномалии системы транспорта спермы, становящиеся причиной бесплодия. К обструктивной азооспермии приводят врожденные отсутствие тела или хвоста эпидидимиса, дефекты структуры семявыносящего протока или же нарушение проходимости канальцев *rete testis*. Приобретенные формы обструкции транспорта спермы на уровне эпидидимиса и эякуляторных протоков бывают следствием генитальной инфекции – гонорейной, хламидийной, уремикоплазменной, туберкулезной и др. Обструктивная азооспермия может быть вызвана блокадой дистальных эякуляторных протоков, возникающей у мужчин с фимозом, приобретенной стриктурой уретры, гипо- и эписпадией.

Поскольку семенная жидкость является в основном продуктом семенных пузырьков (почти на 70%) и лишь на 30% – эпидидимиса, объем эякулята у мужчин с проксимальной обструкцией протоков снижен незначительно, тогда как при дистальной обструкции – резко уменьшен.

К нарушениям транспорта спермы следует отнести ретроградную эякуляцию, при которой сперма попадает не в уретру, а в мочевой пузырь из-за дисфункции его выходного клапана, который в норме перекрывает мочевой пузырь во время семяизвержения. Ретроградная эякуляция бывает следствием повреждения спинного мозга, диабетической нефропатии, люмбарной симпатэктомии, иногда она возникает как осложнение трансуретральной простатэктомии или оперативного вмешательства на шейке мочевого пузыря.

Эндокринные нарушения

Нарушения, возникающие на различных уровнях нейрогормональной системы, регулирующей сперматогенез, играют существенную роль в патогенезе бесплодия у мужчин. Эндокринные нарушения составляют, по данным различных авторов, от 15 до 30% случаев мужского бесплодия. Они могут возникать внутри-

утробно в результате аномалии половых хромосом, при эндогенных и экзогенных интоксикациях в процессе развития мужских половых органов. Эндокринные нарушения могут носить приобретенный характер в результате постнатального нарушения развития или повреждения яичек.

Мужской гипогонадизм, или тестикулярная недостаточность

Это патологическое состояние, клиническая картина которого обусловлена снижением уровня андрогенов в организме с одновременным, как правило, нарушением сперматогенеза. Гипогонадизм может сопровождаться недоразвитием внут-

ренних или наружных половых органов и вторичных половых признаков, а также нарушением фертильности различной степени выраженности или бесплодием. Уровень андрогенов определяется функционированием гипоталамо-гипофизар-

но-тестикулярной оси (рис. 27). На основании нарушений этой оси выделяют первичный и вторичный мужской гипогонадизм.

Первичный (тестикулярный) гипогонадизм возникает в результате первичного поражения яичек (тубулярная недостаточность), что в свою очередь вызывает снижение секреции тестостерона и усиление секреции ФСГ и ЛГ по механизму отрицательной обратной связи.

Вторичный гипогонадизм – результат различных поражений гипоталамо-гипофизарной системы, следствием которых является снижение секреции ФСГ и ЛГ.

Как первичный, так и вторичный гипогонадизм может быть врожденным или приобретенным.

Классификация мужского гипогонадизма (Балаболкин М.И., 2002):

I. Первичный врожденный гипогонадизм:

A. Нарушение развития гонад:

- а) дисгенез семенных канальцев – синдром Клайнфелтера (47,XXY) и его варианты;
- б) микроделеции Y-хромосомы;
- в) аплазия герминативных клеток (синдром наличия только клеток Сертоли), или синдром Дель Кастильо;
- г) анорхизм;
- д) синдром Ульриха–Нунан, или синдром Тернера у мужчин;

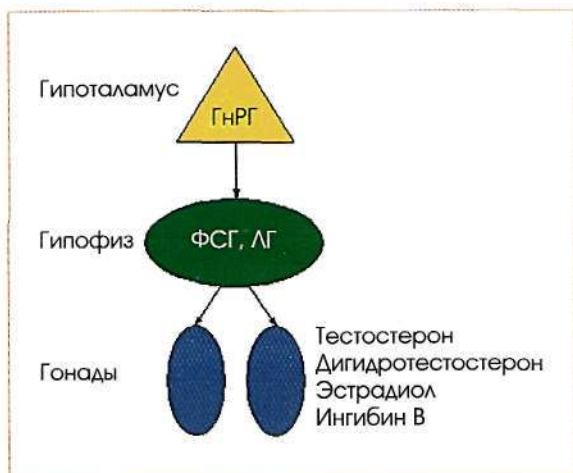


Рис. 27. Гипоталамо-гипофизарно-тестикулярная ось. ГнРГ, формирующийся в нейроэндокринных клетках гипоталамуса, стимулирует синтез ФСГ и ЛГ гипофизом, те, в свою очередь, активируют в яичках сперматогенез и продукцию половых гормонов (тестостерона, эстрадиола) и гонадного пептида ингибина В

- е) синдром истинного агонадизма;
- ж) синдром рудиментарных яичек;
- з) дисгенез гонад, или синдром Свайера;
- и) агенез клеток Лейдига;
- к) синдром 46,XX у мужчин, или синдром де ля Шапеля;
- л) синдром ХУУ;
- м) синдром неподвижности ресничек.

Б. Нарушение развития протоков:

- а) аплазия вольфовых протоков;
- б) дисгенез вольфовых протоков (кистозный фиброз);
- в) синдром персистенции мюллеровых протоков.

В. Нарушение дифференцировки уrogenитально-го синуса и половых органов (мужской псевдогермафродитизм).

Г. Недостаточность биосинтеза андрогенов:

- а) недостаточность 20,22-десмолазы;
- б) недостаточность 3β-гидроксистероиддегидрогеназы;
- в) недостаточность 17α-гидроксилазы;
- г) недостаточность 17,20-десмолазы;
- д) недостаточность 17β-гидроксистероиддегидрогеназы.

Д. Недостаточность биологического действия андрогенов:

- а) недостаточность рецепторов к андрогенам;
- б) синдром полной нечувствительности к андрогенам – синдром тестикулярной феминизации;
- в) синдромы неполной чувствительности к андрогенам и синдром Рейфенштейна;
- г) недостаточность 5α-редуктазы типа 2.

II. Первичный приобретенный гипогонадизм:

- а) инфекция и вирусы: орхит после эпидемического паротита, лепра и др.;
- б) крипторхизм;
- в) травма яичек;
- г) облучение яичек;
- д) аутоиммунная недостаточность яичек;
- е) идиопатическая олигозооспермия или азооспермия.

III. Вторичный врожденный гипогонадизм:

- а) гипогонадотропный гипогонадизм, или синдром Каллмана;
- б) изолированная недостаточность ЛГ, или синдром фертильных евнухов;
- в) изолированная недостаточность ФСГ.

IV. Вторичный приобретенный гипогонадизм:

- а) приобретенная недостаточность гонадотропинов – гипопитуитаризм (воспалительные процессы, травмы с переломом основания черепа, сосудистые аневризмы);
- б) синдром гиперпролактинемии;

- в) хронические системные заболевания;
- г) уремия;
- д) гемохроматоз.

В табл. 4 представлены проявления мужского гипогонадизма в зависимости от причины и уровня повреждения репродуктивной системы.

Таблица 4

Мужской гипогонадизм

Место первичного повреждения	Болезнь	Тестостерон	ЛГ	ФСГ	Бесплодие	Причина
Яички	Синдром Клайнфелтера	↓	↑	↑	+	Хромосомная полиплоидия (XXY)
	Тубулярная недостаточность	Норма	Норма	↑	+	Варикоцеле
	Тестикулярная атрофия	↓	↑	↑	+	Орхит, травма, врожденная аномалия, алкоголизм, уремия, облучение, перегревание
	Мужской псевдогермафродитизм	↓	↑	↑	+	Нарушение синтеза андрогенов, врожденная аномалия
	Синдром ХУУ («супермен»)	Норма/↑	Норма/↑	Норма/↑	+/-	Хромосомная аномалия
	Синдром Ульриха–Нуан	Норма/↓	Норма/↑	Норма/↑	+/-	Врожденная патология
	Синдром наличия только клеток Сертоли	Норма/↓	Норма/↓	↑	+	Врожденная патология
Гипофиз	Гипопитуитаризм	↓	↓	↓	+	Опухоль
	До пубертата	↓	↓	↓	+	Возрастное
	Гиперпролактинемия	↓	↓	↓	+	Пролактинома, травма, операция на железе
	Гиперэстрогемия	Норма/↓	Норма/↓	↓	+	Цирроз печени, прием эстрогенов
	Изолированная недостаточность ЛГ (синдром фертильных евнухов)	↓	↓	↑	+/-	Дефицит ЛГ
	Изолированная недостаточность ФСГ	Норма	Норма	↓	+	Дефицит ФСГ
Гипоталамус	Идиопатическая задержка пубертата	Норма/↓	Норма/↑	Норма/↑	+/-	Возрастное
	Гипогонадотропный гипогонадизм, или синдром Каллмана	↓	↓	↓	+	Врожденный дефицит ГнРГ
	Гипопитуитаризм	↓	↓	↓	+	Опухоль или функциональная причина (кахексия, стресс)
	Синдром Лауренса–Муна–Бидля	↓	↓	↓	+	Нарушение импульсной секреции ГнРГ
Органы-мишени для андрогенов	Синдром полной нечувствительности к андрогенам – синдром тестикулярной феминизации	Норма/↑	↑	↑	+	Дефект андрогеновых рецепторов
	Синдром Рейфенштейна	Норма	Норма	Норма	+	Дефицит андрогеновых рецепторов

Первичный врожденный гипогонадизм

В случаях первичного врожденного гипогонадизма имеют место генетические нарушения, вызывающие изменения структуры яичек или сперматогенного эпителия. С помощью стандартного хромосомного анализа выявляются нарушения кариотипа, которые сочетаются с бесплодием.

В ходе мейоза сперматогоний могут возникать ошибки, в частности нерасхождение одной из пар хромосом приводит к анеуплоидии. Аналогичным образом в женском организме формируется гаплоидная яйцеклетка, поэтому образующаяся при оплодотворении зигота получает диплоидный набор хромосом. При слиянии яйцеклетки, несущей две X-хромосомы, с Y-несущим сперматозоидом у потомства возникает трисомия XXУ. Кариотип 47,XXУ является врожденной генетической аномалией – синдромом Клайнфелтера, при котором наблюдается абсолютная стерильность, отсутствие динеина в жгутиках сперматозоидов, нечувствительность клеток-мишеней к тестостерону (синдром тестикулярной феминизации), отсутствие фермента 5 α -редуктазы, превращающего тестостерон в дигидротестостерон (синдром Рейфенштейна). Примерно у половины пациентов с синдромом Клайнфелтера сперматогонии представлены двумя генетическими типами: 47,XXУ и 46,XY; в этом случае в биоптате яичек удается обнаружить круглые сперматиды, причем более 90% этих клеток имеют нормальный хромосомный набор, однако в относительно большом количестве присутствуют также сперматиды 24,XX и 24,XY. Если же все сперматогонии имеют кариотип 47,XXУ, то в этом случае у пациентов полная аспермия.

Мутации генов половых хромосом у мужчин проявляются с неизбежностью в силу негомолочности X- и Y-хромосом. X-хромосома несет гораздо больше генов, чем Y-хромосома, и их мутации дают целый спектр врожденных патологий. Одна из них – синдром тестикулярной феминизации, обусловленный мутацией гена, ответственного за синтез андрогенового рецептора. Эта мутация приводит к отсутствию рецептора к тестостерону в генетически мужском организме, а следовательно, к нечувствительности к данному гормону; в результате у лиц с кариотипом

46,XY развивается женский фенотип, и они полностью стерильны.

Признаки функционирования яичек отсутствуют при *анорхизме* – врожденном отсутствии мужских гонад. Доля врожденных аномалий яичек может достигать 5% от причин бесплодия у мужчин.

Первичная гонадная недостаточность при синдроме Клайнфелтера, орхите, крипторхизме, синдроме резистентности к андрогену характеризуется увеличением ЛГ и ФСГ в сыворотке крови в два и более раз по сравнению с нормой. Для Сертоли-клеточного синдрома (синдром Дель Кастильо) свойственен высокий уровень ФСГ в крови на фоне нормального содержания ЛГ и тестостерона. Для уточнения диагноза рекомендуется проведение биопсии яичек, где выявляется аплазия сперматогенного эпителия и полное отсутствие сперматогенеза. В качестве альтернативного неинвазивного метода оценки гонадной недостаточности в последнее время используется определение концентрации ингибина В в сыворотке крови, который является маркером функциональной активности клеток Сертоли. При первичной гонадной недостаточности лечение бесплодия у этих больных бесперспективно.

Первичный приобретенный гипогонадизм

Гипогонадизм может быть обусловлен воспалительным процессом непосредственно в яичке (*орхит*), который является осложнением вирусного паротита или вызван вирусами Коксаки или герпеса. К выраженной олигоастенотератозооспермии может привести скрытый хламидийный или микоплазменный орхит.

Причиной нарушения сперматогенной функции зачастую является неопущение одного или обоих яичек в мошонку во внутриутробном периоде (*крипторхизм*), что наблюдается у 3–5% младенцев мужского пола, из которых у трети без соответствующего лечения яички остаются в брюшной полости или паховом канале к моменту полового созревания. Если опущение яичка не выполнено до 2 лет, сперматогенная функция необратимо нарушается и при двустороннем крипторхизме приводит к неизлечимому бесплодию, а при одностороннем – к олигозооспермии различной степени выраженности. Яичко, низведен-

ное в позднем детском возрасте или в период полового созревания, часто прогрессивно уменьшается вплоть до размеров горошины, что получило название *синдрома исчезнувшего яичка*. При этом крипторхическое яичко оказывает выраженное воздействие на нормальное яичко, находящееся в мошонке, поэтому оно обычно уменьшено в размерах и недоразвито. Спермограмма при данной патологии соответствует различной степени олигоастенотератозооспермии вплоть до азооспермии, а гормональные исследования обычно демонстрируют низкие значения тестостерона и повышенные ЛГ и ФСГ. Опасность крипторхизма заключается еще и в том, что неопустившееся яичко предрасположено к озлокачествлению.

Повреждение яичка может быть вызвано токсическим действием некоторых химических веществ, таких, как пестициды, тяжелые металлы, избыточным приемом кортикостероидов, анаболических стероидов, ингибиторов андрогенов. Токсическое воздействие при этом может быть избирательным: так, миелосан повреждает делящиеся сперматогенные клетки, но не воздействует на клетки Лейдига, в то время как этилендиметилсульфонат приводит к тотальной гибели всех клеток Лейдига.

Повреждение яичек может быть вызвано рядом физических факторов, таких, как ионизирующее, рентгеновское излучение, длительная гипертермия или переохлаждение. Крайней степенью такого повреждения является полное исчезновение сперматогенных клеток из семенных канальцев, остаются лишь клетки Сертоли (*Сертоли-клеточный синдром, или синдром Дель Кастильо*).

Кроме значительного снижения продукции сперматозоидов, для первичного гипогонадизма характерны определенные гормональные нарушения. При синдроме исчезнувшего яичка, крипторхизме, синдроме Клайнфелтера, вирусном орхите и токсическом поражении обычно наблюдается уменьшение выработки тестостерона и/или сниженный его ответ на стимуляцию. При синдроме резистентности к андрогенам (нечувствительность клеток-мишеней к тестостерону) концентрация тестостерона повышена. Варикоцеле, аплазия яичек, посттравматический орхит сопровождаются обычно нормальным содержанием тестостерона.

В целом определение ФСГ является наиболее важным параметром для прогноза: чем выше уровень этого гормона в крови, тем тяжелее повреждение сперматогенного эпителия и тем более pessimистичен прогноз, касающийся восстановления фертильности. Механизм подобной реакции известен: первичное поражение сперматогенного эпителия сопровождается снижением выработки ингибина В клетками Сертоли. Как было сказано в предыдущем разделе, ингибин В совместно с эстрадиолом регулирует секрецию ФСГ гипофизом по принципу обратной связи. Существует прямая корреляционная зависимость между содержанием ингибина В в крови и концентрацией сперматозоидов в эякуляте. Снятие отрицательной обратной связи приводит к повышению уровня ФСГ в крови, что сопровождается нарушением сперматогенеза в извитых семенных канальцах и снижением концентрации сперматозоидов. Поскольку синтез ФСГ и ЛГ сопряжен, это часто приводит к повышению продукции ЛГ и тестостерона; последний метаболизируется до эстрадиола, который, конкурируя за рецепторы в гипоталамусе, подавляет выработку ГнРГ. Это в конечном итоге обуславливает относительную, а затем абсолютную гипоандрогенемия, что усугубляет патологию сперматогенеза, снижает выраженность вторичных половых признаков, ведет к ослаблению либидо.

Характерной для первичного гипогонадизма является избыточная реакция на экзогенный ГнРГ: при нормозооспермии в ответ на в/в введение ГнРГ уровень ФСГ увеличивается в 2 раза, при умеренной олигозооспермии – в 3 раза, при резкой олигозооспермии (концентрация сперматозоидов менее 5 млн/мл) – более чем в 10 раз. Одновременно при стимуляции гонадотропинами наблюдается незначительное повышение выработки тестостерона или же изменения отсутствуют.

Вторичный врожденный гипогонадизм

Вторичный врожденный гипогонадизм развивается вследствие нарушения секреции гонадотропных гормонов в результате дисфункции гипоталамуса или гипофиза. Гипогонадизм гипоталамического происхождения может быть обусловлен рядом факторов.

Недостаточная выработка ГнРГ (синдром Каллмана) происходит в результате нарушения функции гипоталамуса. В случае краниофарингомы или опухоли возникает механическое препятствие для оттока гормонов.

Нарушение периодичности импульсов ГнРГ служит причиной снижения секреции ЛГ и ФСГ (синдромы Руда и Лауренса–Муна–Бидля). При непериодическом выбросе ГнРГ гипоталамусом не может осуществляться нормальная секреция гипофизом ЛГ и ФСГ, что приводит к низкому их уровню в крови, недостаточной продукции тестостерона и недоразвитию яичек. Клиническая картина – раннее проявление евнухоидизма.

Изолированный дефицит ЛГ (синдром фертильных евнухов) проявляется низким уровнем в крови ЛГ и тестостерона; уровень ФСГ остается в пределах нормы. В клинической картине преобладают импотенция, гинекомастия, но сперматогенез сохранен на субнормальном уровне.

Изолированный дефицит ФСГ характеризуется нормальным содержанием тестостерона и сохранением потенции, однако показатели спермограммы значительно варьируют: от полного отсутствия сперматозоидов до нормального количества малоподвижных, неполноценных сперматозоидов.

Гиперпролактинемия – обособленная патология функции гипофиза. При этом происходит увеличение секреции пролактина, что сопровождается формированием лунообразного лица, нарушением роста бороды, дезорганизацией сперматогенеза, импотенцией. Чаще всего избыточная продукция пролактина является следствием развития опухоли гипофиза, при этом снижается продукция ЛГ, ФСГ, тиреотропина, кортикотропина. Поэтому при относительно низких уровнях в

крови ЛГ, ФСГ и тестостерона целесообразно определить уровень пролактина в крови. При высоком его содержании следует исключить медикаментозную гиперпролактинемия и произвести рентгенографию черепа в боковой проекции, компьютерную или магнитно-резонансную томографию головного мозга. При выявлении аденомы гипофиза (пролактиномы) решают вопрос об оперативном вмешательстве, лучевой терапии или комбинации этих и других способов лечения.

Гипотиреоз. При сниженном уровне гормонов щитовидной железы Т3 и Т4 происходит активация выработки тиреолиберина (TRH). TRH стимулирует одновременно выработку гипофизом тиреотропного гормона (ТТГ) и пролактина, который вызывает нарушения сперматогенеза. Поэтому при обнаружении одновременного повышения уровня пролактина и ТТГ следует исключить гипогонадизм, вызванный гипотиреозом.

Вторичный приобретенный гипогонадизм

Ожирение. В случаях значительного ожирения повышается ароматизация андрогенов до эстрогенов в жировой ткани. Увеличенное образование эстрогенов вызывает блокаду секреции гонадотропного релизинг-гормона (ГнРГ) гипоталамусом, нарушается периодичность секреции ГнРГ, что может быть причиной временного бесплодия. Снижение массы тела восстанавливает нормальную секрецию ГнРГ и эякуляцию у мужчин, так же как менструальные циклы у женщин.

Опухоли гипофиза составляют примерно 10% от всех внутричерепных опухолей (табл. 5). В аденогипофизе (передняя доля) вырабатываются 6 гормонов – АКТГ, СТГ, ФСГ, ЛГ, ТТГ и пролактин. Аде-

Таблица 5

Опухоли гипофиза

Гистологическая классификация		Классификация по секретируемому гормону	
Хромофильные: • из продуцирующих гормоны половина дают пролактин, некоторые АКТГ или гормон роста • несекретирующие вызывают гипопитуитаризм	70%	Пролактин (только)	35%
		СТГ	20%
		Пролактин + СТГ	7%
		АКТГ	7%
Ацидофильные • секретируют СТГ или пролактин	15%	ЛГ/ФСГ/ТТГ	1%
Базофильные • секретируют АКТГ	15%	Несекретирующие опухоли	30%

нома гипофиза часто бывает нефункционирующей, при этом развивается гипопитуитаризм, однако чаще всего опухоль продуцирует один из гормонов, при этом продукция других бывает подавленной. Если вырабатывается только пролактин, это пролактинома. При гиперсекреции СТГ развивается акромегалия, при гиперсекреции АКТГ – болезнь Кушинга.

Уремия постепенно приводит к атрофии гонад с прекращением сперматогенеза, дисфункции эрекции и снижению либидо. Обычно при уремии имеет место сниженный уровень тестостерона и повышение ЛГ и ФСГ. Часто выявляется гипер-

пролактинемия, которая дополнительно ухудшает сексуальные возможности мужчины.

Курение. Дым сигарет содержит много вредных веществ, некоторые из них (в частности, акролеин) являются токсическими веществами для сперматогенеза. Курение усиливает окисление макромолекул, которые присутствуют в яичках. У курильщиков выявлено некоторое снижение объема спермы и жизнеспособности сперматозоидов. Молекулярно-биологические исследования последних лет выявили, что курение может вызвать повреждение ДНК спермы и даже ДНК эмбриона.

Таблица 6

Изменения сывороточных гормонов при алкоголизме и патологии печени (Becker et al., 2000)

Заболевание	Кол-во больных	ФСГ	ЛГ	Эстрадиол	Тестостерон	SHBG
Цирроз (мужчины)	117	↑	↑	↑	↓	↑
Цирроз (женщины в постменопаузе)	10	↓	↓	↑	Норма	↑
Другая патология печени	10	Норма	↑	↑	↓	↑
Алкоголизм без патологии печени	19	↑	↑	↑	↓	Норма
Импотенция без органической патологии	45	↑	↑	↑	↓	–
Импотенция с органической патологией	37	Норма	Норма	↑	↓	–

Таблица 7

Препараты и лекарственные средства, способные вызвать гипогонадизм

Действующее начало	Наименование препарата	Фармакологический класс
Актиномицин D	Космеген	Противоопухолевый
Аминотриптилен	Лароксил	Антидепрессант
Бусульфан	Муренал	Противоопухолевый
Хлорамбуцил	Лейкеран	Противоопухолевый
Колхицин	Колхицидум	Алкалоид
Циметидин	Тагамет	Антигистаминовый
Циклофосфамид	Эндоксан	Противоопухолевый
Ципротеронацетат	Андрокур	Антиандрогенный
Дигитоксин	Дигимерк	Сердечный гликозид
Дигоксин	Ланикор	Сердечный гликозид
Кетоконазол	Низорал	Противогрибковый
Левометадон	Поламидон	Наркотический анальгетик
Метотрексат	Метотрексат	Противоопухолевый
Нандролон	Анадур	Анаболик
Нитрафурантоин	Фурадантин	Бактериостатик
Сульфасалазин	Асульфидин	Антибиотик
Спиринолактон	Альдактон	Гипотензивный
Тестостеронпропионат	Тестовирон	Андроген
Транилципромин	Парнат	Ингибитор MAO
Триметоприм	Триманил	Антибиотик
Марихуана и другие наркотики		

Алкоголизм приводит к гипогонадизму через несколько механизмов. Этиловый спирт оказывает прямой токсический эффект на тестикулы. Кроме того, алкоголь вызывает снижение синтеза ретинола, который участвует в метаболизме витамина А, в результате нарушается сперматогенез. В табл. 6 представлены данные по изменению гормонального профиля у больных алкоголизмом, алкогольным циррозом печени и некоторыми другими заболеваниями.

Сахарный диабет, как правило, не вызывает гипогонадизма или патологических изменений содержания тестостерона, ЛГ или ФСГ, однако он способствует нарушению эрекции вследствие диабетической нейропатии и ангиопатии.

Ятрогенные факторы. Многие лекарственные препараты способны вызвать гипогонадизм, влияя прямо на сперматогенез в яичках (первичный гипогонадизм) или на гипоталамо-гипофизарную систему (вторичный гипогонадизм). Наркотики, включая героин, морфин, метадон, вызывают центральную активацию опиоидных механизмов, которые существенно подавляют гипоталамическую секрецию рилизинг-гормонов и соответственно ингибируют образование ЛГ и тестостерона. Героин и гашиш вызывают подавление сперматогенеза, часто с развитием олигоастенозооспермии и некроспермии.

Некоторые препараты, способные вызвать гипогонадизм, представлены в табл. 7.

Лабораторная диагностика мужского гипогонадизма

Показания к гормональному обследованию мужчины:

- Данные анамнеза, объективного обследования и вспомогательных диагностических методов, позволяющие заподозрить эндокринный генез патологии репродуктивной сферы.
- Патологическая спермограмма.

Базовая гормональная диагностика

По базовой гормональной диагностике оценивают функцию гонадной оси и проводят дифференциальную диагностику между первичным и вторичным гипогонадизмом. Она включает определение в крови содержания ЛГ, ФСГ, пролактина и тестостерона. При необходимости диагностическую панель расширяют, включая определение эстрадиола, ТТГ и других гормонов. В настоящее время получает все большее подтверждение тот факт, что концентрации некоторых белковых субстанций (антиспермальных антител, ингибина В) в сыворотке крови и/или сперме могут служить маркерами фертильности.

ЛГ стимулирует выработку и секрецию тестостерона, поэтому его определение особенно важно при обследовании по поводу гипогонадизма. При одновременном измерении ЛГ и тестостерона удается дифференцировать гипофункцию яичек от гипофизарной и гипоталамической недостаточности.

ФСГ у мужчин стимулирует рост и функционирование клеток Сертоли и опосредованно сперматогенез:

1. Уровень ФСГ в норме – это наиболее частый результат исследований. В этом случае, поскольку гормональных отклонений не выявлено, по результатам спермограммы можно диагностировать идиопатическую олигоастенотератозооспермию. Можно провести *тест с кломифеном*. Кломифен – структурный аналог синтетического эстрогена диэтилстильбэстрола, который снимает отрицательное обратное действие тестостерона на освобождение ГнРГ из гипоталамуса, тем самым должна повышаться выработка ЛГ и ФСГ гипофизом (положительный кломифеновый тест). Если этого не происходит, то следует говорить о гипогонадотропном евнухоидизме.
2. Уровень ФСГ повышен из-за того, что в яичках недостаточно образуется ингибин В, в результате по принципу обратной связи уровень сывороточного ФСГ значительно превышает норму. Такие результаты являются отрицательным прогностическим признаком. Трудно ожидать от интратубулярных клеток продукции структурно сложно организованных сперматозоидов, когда снижен синтез даже одного белка – ингибина В. Вместе с результатами клинического обследования

(субнормально развитые гонады, крипторхизм) и патологией спермы (олигоастенозооспермия, азооспермия) эти данные могут свидетельствовать о безуспешности какого-либо лечения.

- Уровень ФСГ снижен. Снижение ФСГ ниже нормы встречается в 1% случаев мужского бесплодия. У таких больных возможно проведение эффективной терапии.

С целью дифференциальной диагностики гипофизарной недостаточности от гипоталамической проводят пробу с ГнРГ. Для этого сначала измеряют базальный уровень ФСГ и ЛГ, затем стимулируют гипоталамус введением ГнРГ. Если в ответ на стимуляцию происходит повышение ФСГ в крови в 1,5 или более раз, то проба считается положительной и причиной снижения базального уровня ФСГ является уменьшение синтеза ГнРГ. Таким пациентам показано длительное введение ГнРГ. В случае отсутствия изменения концентрации ФСГ при его стимуляции причиной может являться гипофизарная недостаточность, лечение будет заключаться в заместительной терапии гонадотропинами. Проба с ГнРГ проводится и в том случае, если уровень ФСГ незначительно повышен. В данном случае с помощью этой пробы можно подтвердить или отвергнуть по-

дозревание на наличие тубулярной недостаточности яичек.

В процессе базового обследования могут быть получены следующие результаты:

- При первичном гипогонадизме, когда поражены яички, в крови выявляется высокий уровень гонадотропинов и низкий – тестостерона.
- При вторичном гипогонадизме, когда имеется дефицит гонадотропинов, уровни в крови ЛГ, ФСГ и тестостерона низкие.
- Реже встречается нормогонадотропный гипогонадизм, когда имеет место сочетанное поражение яичек и гипоталамо-гипофизарной области. При этой патологии в крови выявляется низкий уровень тестостерона при нормальных уровнях ЛГ и ФСГ.

Диагностический алгоритм по результатам исследования ЛГ и ФСГ представлен на рис. 28.

Пролактин – пептидный гормон передней доли гипофиза, у мужчин его функция не до конца ясна. В то же время установлено, что гиперпролактинемия может вызвать нарушение репродуктивной функции у мужчин посредством нескольких механизмов. На уровне гипоталамуса гиперпролактинемия нарушает пульсирующий режим выброса ГнРГ. Соответственно гиперпролактинемия приводит к снижению ЛГ и ФСГ и вторичной недостаточности гонад с

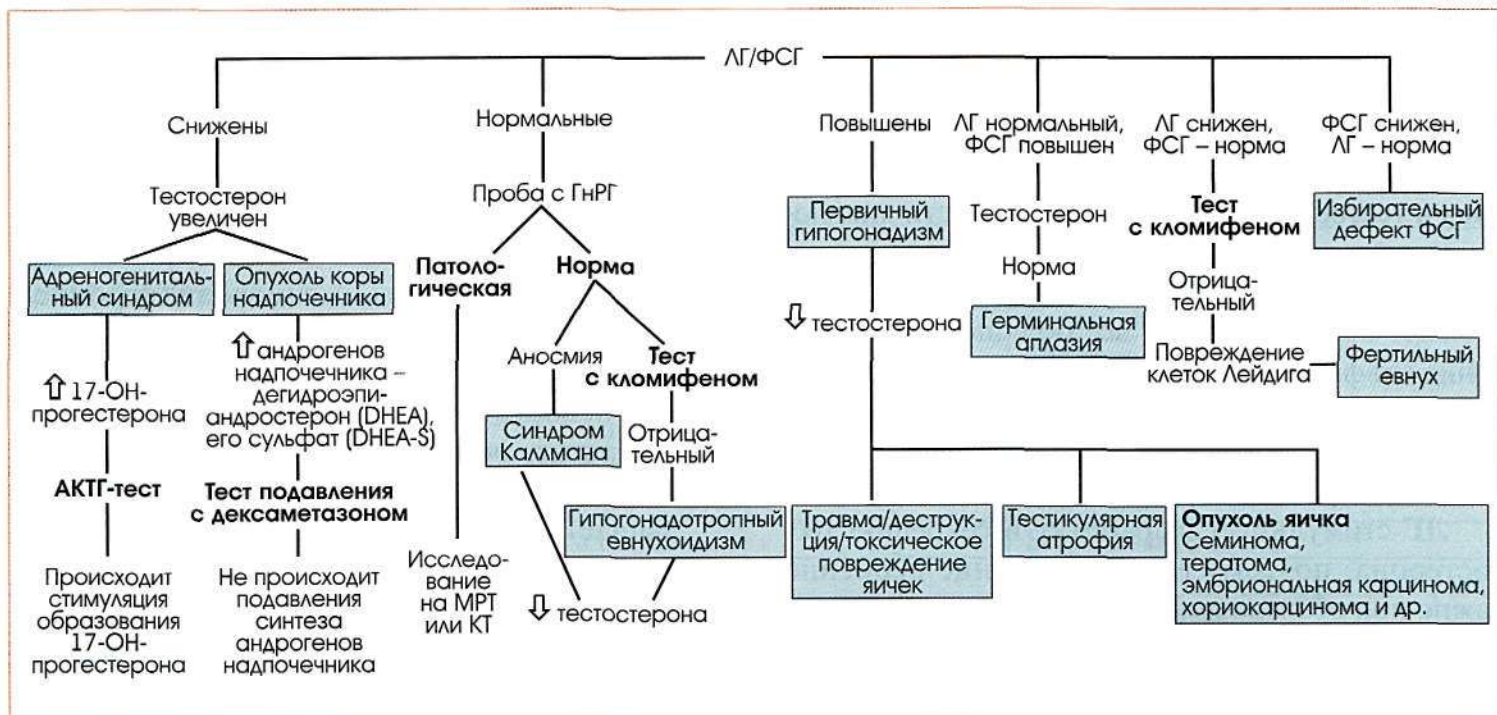


Рис. 28. Диагностический алгоритм причин мужского гипогонадизма, исходя из результатов исследования ФСГ и ЛГ

низким уровнем тестостерона. Прямого действия пролактина на гаметогенез не зарегистрировано, но повышенные концентрации пролактина вызывают дисфункцию гонадной оси, поэтому связь гиперпролактинемии с пониженной фертильностью объясняют, скорее, падением уровня гонадотропинов, чем прямым эффектом пролактина на функцию гонад. Определяют пролактин в случаях бесплодия и импотенции. Гормональное обследование мужчины часто начинают с определения уровня пролактина в крови.

Небольшое повышение пролактина может быть результатом физического или психологического стресса. Однако наиболее частой причиной гиперпролактинемии являются опухоли гипофиза, которые могут быть как микропролактиномами (<10 мм в диаметре), так и макропролактиномами. Секреция пролактина гипофизом находится под влиянием ингибирующего эффекта дофамина, продуцируемого гипоталамусом. Поэтому повреждение гипоталамуса или воздействие лекарственных препаратов группы антагонистов дофамина (фенотиазины, бутирофеноны) могут вызвать гиперпролактинемиию.

Диагностический алгоритм по результатам исследования пролактина у мужчин представлен на рис. 29.

Тестостерон и ДГТ – основные андрогены в организме мужчины. В отличие от женщин у мужчин андрогены надпочечников вносят меньший вклад в андрогенные эффекты. При определении концентрации тестостерона в крови следует помнить, что его значения варьируют в течение дня достаточно широко. Концентрация гормона вечером составляет 60–75% от утреннего его содержания. Недостаточность тестостерона, являющаяся причиной нарушения сперматогенеза, за исключением случаев гипофизарной недостаточности, практически не поддается лечению. Но диагностика этого состояния важна для пациента с той точки зрения, что он может столкнуться в дальнейшем с проблемой деминерализации костей, изменением ментального статуса и с эндокринологически обусловленной импотенцией. В этих случаях заместительная терапия эффективна для предупреждения осложнений, но в плане восстановления фертильности терапия тестостероном бесполезна, так как концентрация тестостерона в яичках более чем в 100 раз превышает его содержание в периферической крови.

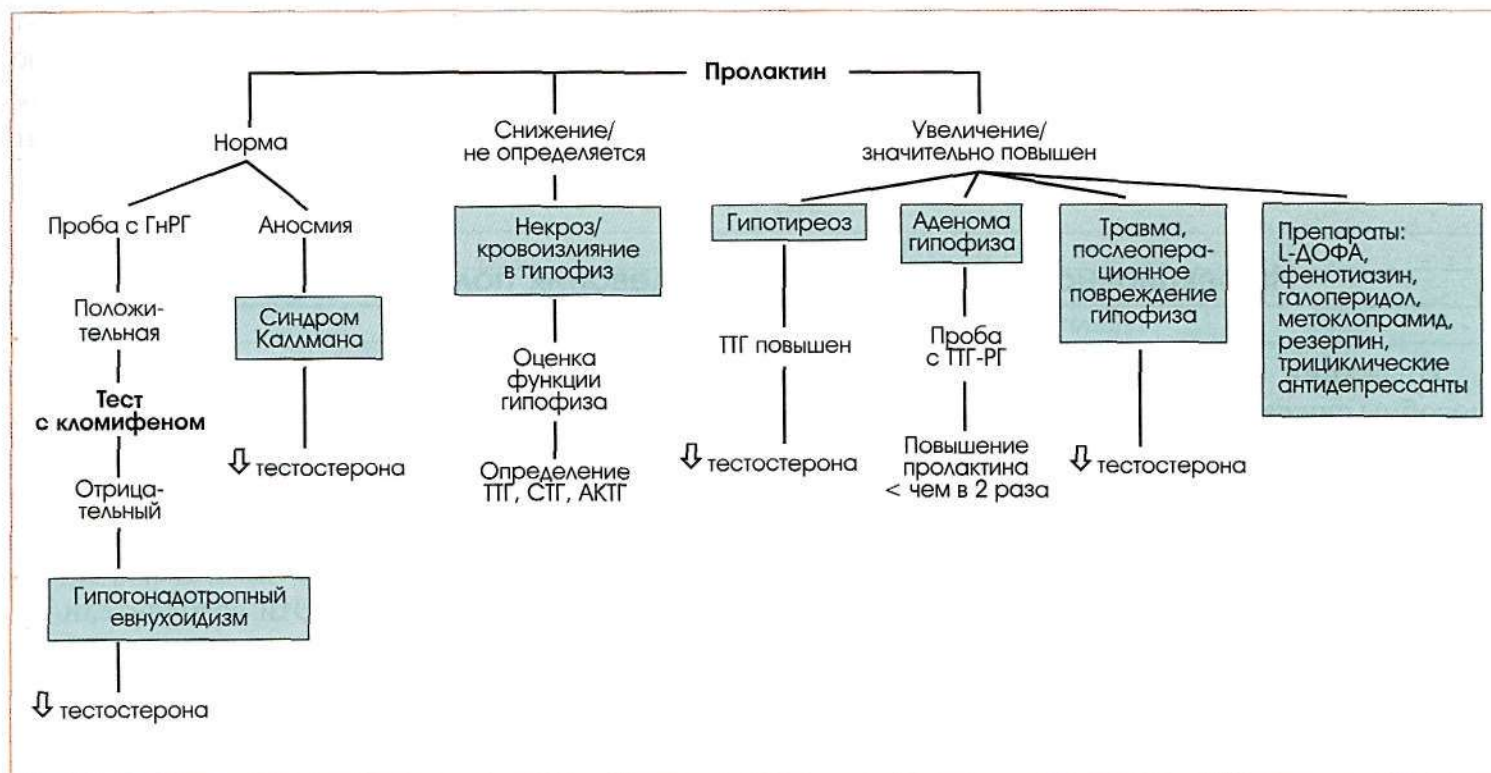


Рис. 29. Диагностический алгоритм мужского бесплодия, исходя из результатов исследования ФСГ, ЛГ и пролактина

Молекулярно-генетические исследования

В настоящее время стремительно развиваются методы диагностики первичного гипогонадизма и мужского бесплодия, в основе которых лежат молекулярно-генетические дефекты. Проводятся сложные научные исследования хромосомных и генных мутаций, приводящих к резистентности андрогенных и ФСГ-рецепторов, недоразвитию органов, тяжелой олиго- или азооспермии и др. Пока эти исследования и возможности диагностики остаются прерогативой специальных центров. Однако технологии настолько быстро развиваются, что можно надеяться, что в обозримом будущем они будут доступны сети андрологических лабораторий.

На Y-хромосоме в эухроматиновой части длинного плеча расположен участок AZF (Azoospermia factor, фактор азооспермии), где находятся гены, регулирующие сперматогенез. Этот участок имеет локусы A, B, C. Мужское бесплодие может быть связано с выпадением (делецией) одного или нескольких локусов, что приводит к тяжелой олигозооспермии или азооспермии. Так как в 10–20% случаев необструктивной олиго/азооспермии наблюдается данная аномалия, существуют рекомендации по исследованию на AZF на лейкоцитах периферической крови у пациентов, концентрация сперматозоидов у которых менее 5 млн в мл.

Мутации в гене трансмембранного регулятора проводимости CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) являются наи-

более частой причиной бесплодия у мужчин (частота встречаемости 1:2500), связанного с врожденным двух- или односторонним нарушением проходимости семявыносящих протоков (синдромы CBAVD и CUAVD) – кистозный фиброз. Этот ген локализован на длинном плече 7-й хромосомы (7q31.2). В настоящее время описано более 700 различных мутаций в этом гене, однако лишь несколько из них встречаются с частотой более 1%. Самой распространенной мутацией является Del F508 (делеция 3 нуклеотидов, кодирующих фенилаланин). Частота ее в России составляет около 55% среди всех мутаций при муковисцидозе.

Помимо мутации гена CFTR, существуют ГТ-варианты полиморфизма гена CFTR (5Т-тимидиновых нуклеотидов) у мужчин с азооспермией. Каких-либо клинических признаков муковисцидоза у пациентов с данным вариантом гена CFTR обычно не отмечается. Частота носительства 5Т-аллельного варианта среди здоровых мужчин составляет около 5% (Ковалевская Т.С. с соавт., 2003).

Ген AR (ген рецептора андрогенов) локализован на длинном плече X-хромосомы в Xq11-12. В первом экзоне гена содержатся (CAG)*n*-повторы, кодирующие полиглутаминовый участок рецептора в позиции 172. В среднем число CAG-повторов в гене AR колеблется в пределах от 17 до 26. При нарушении экспрессии гена AR число CAG-повторов достигает 40 и более, при этом возникает мужское бесплодие и X-сцепленная спинобульбарная мышечная атрофия.

Инфекционно-воспалительные заболевания половых органов

Инфекции органов мочеполовой системы способны снижать фертильность у мужчин. **Прямое повреждение** половых клеток вызывают либо сами микроорганизмы, либо их токсины. **Вторичное воспалительное повреждение** развивается в ответ на инфекционный процесс и сопровождается образованием свободных радикалов и цитокинов. В зависимости от локализации инфекционного процесса у мужчин наиболее часто развивается *уретрит* (воспаление мочеиспускательного канала), *цистит* (воспаление мочевого пузыря), *простатит* (воспаление предстательной железы), *эпидидимит* (воспаление при-

датка яичка), *орхит* (воспаление яичка). Острый эпидидимит может распространиться на яички (эпидидимоорхит).

Наиболее часто инфекционные поражения в половых органах вызывают гонококк Нейссера, различные серотипы хламидий, бледная трепонема, трихомонады (рис. 30). Эти возбудители являются патогенами. Кроме того, существует группа микроорганизмов, таких, как *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, различные виды *Proteus*, а также стрептококки и стафилококки, грибы рода *Candida*, микобактерии туберкулеза и другие микроорганизмы, способные вызывать воспаление в по-

Сифилис	12 миллионов	3,5%
Хламидиоз	92 миллиона	27,1%
Гонорея	62 миллиона	18,2%
Трихомониаз	174 миллиона	51,2%
Общее число	340 миллионов	

Рис. 30. Заболеваемость ИППП в мире. Данные из доклада ВОЗ (1999 г.)

ловых органах при снижении иммунной защиты. В то же время при бактериологическом исследовании спермы пациентов с воспалением органов мочеполового тракта выявляются различные возбудители, но в 77% случаев имеют место ассоциации 2 и более микроорганизмов (Тер-Аванесов Г.В., 2000).

Большинство инфекций, вызывающих воспаление половых органов, относится к инфекциям, пе-

Таблица 8

Классификация инфекций, передаваемых половым путем (Адаскевич В.П., 2004)

Заболевание	Возбудитель
Венерические заболевания	
Сифилис	<i>Treponema pallidum</i>
Гонорея	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Шанкроид (мягкий шанкр)	<i>Haemophilus ducreyi</i>
Лимфогранулематоз венерический	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Гранулема венерическая (паховая)	<i>Calymmatobacterium granulomatis</i>
ИППП с преимущественным поражением половых органов	
Урогенитальный хламидиоз	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Мочеполовой трихомониаз	<i>Trichomonas vaginalis</i>
Урогенитальный кандидоз	<i>Candida albicans</i>
Мочеполовой микоплазмоз	<i>Mycoplasma hominis</i>
Генитальный герпес	<i>Herpes simplex virus</i>
Цитомегалия	<i>Cytomegalovirus hominis</i>
Папилломавирусные инфекции	<i>Papillomavirus hominis</i>
Контагиозный моллюск генитальный	<i>Molluscovirus hominis</i>
Урогенитальный шигеллез	<i>Shigella species</i>
Лобковый педикулез (фтириаз)	<i>Phthirus pubis</i>
Чесотка	<i>Sarcoptes scabiei</i>
ИППП с преимущественным поражением других органов	
ВИЧ	<i>HIV</i>
Гепатит В (С, D)	<i>Hepatitis B (C, D) virus</i>
Амебиоз	<i>Entamoeba histolytica</i>
Лямблиоз	<i>Lamblia (Giardia) intestinalis</i>

редаваемым половым путем (ИППП). В настоящее время насчитывается более 20 ИППП (табл. 8). Они характеризуются высокой контагиозностью и сравнительно быстрым распространением среди населения. В то же время в европейских странах

считается, что из всех ИППП только гонорея и сифилис являются значимыми венерическими заболеваниями, приводящими к бесплодию мужчин, при других инфекциях такое осложнение возникает редко.

Гонорея

Гонорея – инфекционное заболевание, вызванное грамотрицательным диплококком *Neisseria gonorrhoeae*. Гонококки имеют хорошо выраженную трехслойную наружную стенку и цитоплазматическую мембрану, цитоплазму с рибосомами и ядерной вакуолью. Гонококки обычно располагаются внутриклеточно в цитоплазме лейкоцитов, как правило группами, но иногда можно видеть и внеклеточных гонококков. Гонококки имеют несколько плазмид, одна из которых несет ген продукции β -лактамазы, обеспечивающей резистентность гонококков к пенициллину. В последние годы отмечаются изменения биологических свойств гонококков: наличие капсул, фагосом, β -лактамазы, снижение чувствительности к антибиотикам, появление L-форм. Гонорея является одной из наиболее распространенных венерических болезней, социальная значимость гонореи связана с неблагоприятным влиянием на демографические показатели, так как она способствует развитию бесплодия населения.

Заболевание передается преимущественно половым путем, хотя возможен и бытовой путь передачи. У мужчин гонококки, как правило, сначала вызывают уретрит, у гомосексуалистов начальным, а иногда и единственным очагом инфекции может быть прямая кишка.

Гонококки приспособились паразитировать на слизистых оболочках, выстланных цилиндрическим эпителием (уретра, нижняя часть прямой кишки, глотка). Процесс может распространяться также и на предстательную железу, семенные пузырьки, придатки яичек, яичко, семявыносящие протоки. Попав на слизистую уретры, гонококки через межклеточные пространства спустя 3–4 дня достигают субэпителиальной соединительной ткани, вызывая воспалительную реакцию. Уретральные выделения – это результат миграции нейтрофилов, лимфоцитов и плазматических клеток к месту внедрения гонококков. Гонококки могут располагаться как внутри нейтрофилов в результате фагоцитоза, так и на эпителиальных клетках в результате адгезии. Гонококки проникают в лимфатические сосуды и таким образом быстро разносятся от первичного очага инфекции в более удаленные отделы мочеполового тракта. Показано, что эндотелиоци-

ты лимфатических капилляров могут также фагоцитировать гонококки.

Острая форма свежего гонорейного уретрита характеризуется значительной воспалительной реакцией: из уретры свободно вытекают гнойные выделения желтовато-зеленоватого цвета. При двухпорционной пробе моча в первой порции мутная от примеси гноя, во второй – прозрачная. Если воспаление распространяется и на задний отдел уретры, то возникают симптомы уретроцистита: учащенное мочеиспускание с императивными позывами, резкие боли в конце мочеиспускания вследствие спазма воспаленного внутреннего сфинктера мочевого пузыря, тотальная пиурия, нередко терминальная гематурия. При вовлечении в процесс семенного бугорка развиваются симптомы колликулита – учащенные болезненные эрекции, гемоспермия. При отсутствии лечения процесс, как правило, переходит в хроническую форму.

Подострая форма гонорейного уретрита встречается наиболее часто. Воспалительная симптоматика выражена значительно меньше, чем при остром уретрите, отделяемое скудное, накапливается только после длительного перерыва в мочеиспускании, выделения, как правило, гнойно-слизистые, беловатого цвета. При двухпорционной пробе моча в первой порции бывает мутной или опалесцирующей, с тяжелыми гнойными нитями.

Торпидная форма свежего гонорейного уретрита клинически неоднородна, поэтому ее называют также субклинической, малосимптомной, субъективно асимптомной. Эта форма с самого начала сопровождается незначительными субъективными и объективными расстройствами. Скудные слизисто-гнойные выделения отмечаются только по утрам, иногда лишь при выдавливании. Нередко отделяемого настолько мало, что оно остается на стенках в глубине уретры. Моча большей частью прозрачная, с единичными гнойными нитями и хлопьями в первом стакане. Хронический гонорейный уретрит внешне напоминает торпидный свежий уретрит и также характеризуется малосимптомностью. Обычно внешние симптомы сводятся к «утренней капле» – небольшому скоплению уретрального экссудата, выдавливаемому утром после сна.

Эпидидимиты чаще всего являются следствием трансканаликулярного распространения гонококков при антиперистальтических сокращениях семявыводящих протоков, закономерно возникающих при раздражении семенного бугорка и при половом акте. Известно быстрое развитие эпидидимита после эндоуретральных вмешательств, грубого массажа предстательной железы и семенных пузырьков у больных задним гонорейным уретритом. Гонококковые поражения придатков приводят к образованию рубцов в протоках придатков яичек. В результате этого наступают азооспермия и бесплодие. Деферентит (поражение семявыносящего протока) и фуникулит (поражение семенного канатика) наблюдаются одновременно с поражением придатков яичек. Орхит (поражение яичка) встречается редко.

Простатит протекает остро или переходит в хроническую форму. По характеру и степени поражения различают катаральный, фолликулярный и паренхиматозный простатит. При катаральном простатите протоки прилегающих железистых долек предстательной железы воспалены, инфильтрированы, в их просвете имеется незначительное количество лейкоцитов, слизи, эпителия, гонококков. Моча прозрачная с примесью единичных нитей и хлопьев слизи. Простатит может быть распознан только при микроскопическом исследовании секрета, в котором выявляется умеренное количество лейкоцитов, а также гонококков. Фолликулярный простатит развивается вследствие дальнейшего распространения воспалительного процесса с закупоркой выводных протоков железы и образованием наполненных гноем изолированных фолликулов. Паренхиматозный простатит возникает при вовлечении в процесс мышечно-эластической стромы предстательной железы. Отдельные воспалительные инфильтраты, разрушая паренхиму железы, сливаются между собой и образуют вначале ограниченные гнойные полости, которые могут сливаться в один большой абсцесс, захватывающий целую долю или всю железу.

При хроническом простатите появляются функциональные расстройства мочевого аппарата: ослабление эрекции, преждевременная эякуляция, снижение оргазма. В секрете предстательной железы отмечается повышенное содержание лейкоцитов, уменьшение числа липоид-

ных телец, а иногда их полное отсутствие. Гонококки в секрете предстательной железы больных хроническим простатитом обнаруживаются редко. Простатит может быть вызван и смешанной инфекцией: гонококковой и трихомонадной, хламидийной или другими бактериями или вирусами.

Везикулит (воспаление семенных пузырьков) часто сочетается с простатитом и эпидидимитом. Клинические проявления везикулита обычно завуалированы симптомами эпидидимита или простатита. Возможны терминальная гематурия, повышенная половая возбудимость, частые поллюции и эрекции, болезненные эякуляции, а также пио- и гемоспермия.

Гематогенная диссеминация с образованием гонококковых метастазов возникает редко, только в случае утраты сывороткой крови бактерицидных свойств. При нормальной реакции иммунной системы попавшие в кровь гонококки сразу же погибают под влиянием сывороточных киллинг-факторов.

Лабораторная диагностика гонореи

Верификация диагноза гонореи осуществляется на основании лабораторного обнаружения гонококков с типичными морфологическими и тинкториальными свойствами. Для выявления гонококков используют микроскопию и культуральное исследование с определением ферментативных свойств гонококка. Все остальные методы диагностики имеют вспомогательное значение, их положительные результаты указывают на необходимость повторного и более тщательного поиска гонококков.

Провокации с использованием иммунологических, химических, термических воздействий применяются при определенных условиях, с учетом возможных осложнений и последствий при их проведении.

Для микроскопического и культурального исследования используют отделяемое из уретры, парауретральных ходов, предстательной железы, прямой кишки, носоглотки, иногда исследуют сперму и синовиальную жидкость. При системных поражениях желательнее произвести посев крови. Кроме того, исследованию подлежат все материалы, подозрительные на наличие гонокок-

ков. Материал для исследования должен брать лечащий врач, учитывая клинику заболевания, что обеспечит получение наиболее пригодного для исследования материала.

У мужчин отделяемое слизистой оболочки берут петлей из глубины уретры, предварительно очистив ее отверстие тампоном, смоченным физиологическим раствором. При малом количестве выделений до взятия материала производят массаж уретры в дистальном направлении.

Мазки окрашивают либо 1% водным раствором метиленового синего, либо по Романовскому–Гимзе (рис. 31), а также по Граму. Окончательное заключение дают только на основании окраски по Граму. При остром процессе в мазках, окрашенных по Граму, обнаруживают большое количество грамнегативных как вне-, так и внутриклеточно расположенных диплококков (рис. 32).

При правильной окраске по Граму ядра лейкоцитов и эпителиальных клеток должны быть окрашены в фиолетовый цвет, а гонококки – в розовый. В заключении должно быть отмечено наличие другой бактериальной флоры, трихомонад, грибов и т. д., а также клеточных элементов (эпителиальные клетки, лейкоциты, эритроциты). При хроническом процессе, когда отделяемого становится меньше и в нем содержится меньше лейкоцитов, гонококки нередко обнаруживаются с трудом, особенно внутриклеточные, величина и форма их не всегда одинаковы, дополнительную сложность могут представлять редкие варианты

грам-вариабельности гонококков. Поэтому для полноценной и достоверной диагностики необходимо дополнительно провести культуральное исследование.

При проведении бактериологического исследования в нашей стране используют асцит-агар или безасцитные питательные среды. При посеве материала, загрязненного посторонней флорой, необходимо применять среды с добавлением антибиотиков (полимиксина, линкомицина и т. д.), которые подавляют рост грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, не влияя на рост гонококков. При невозможности проведения непосредственного посева патологического материала на питательную среду на месте необходимо использовать транспортные среды, которые служат для сохранения жизнеспособности гонококков. Наиболее распространенной является среда Стюарта. Для идентификации гонококков используют исследование их ферментативных свойств, в первую очередь оксидазной активности.

Для выявления антигенов гонококков в мазках с отделяемым из уретры используют метод прямой иммунофлюоресценции, а также модифицированный так называемый замедленный метод, представляющий собой комбинацию бактериологического исследования и иммунофлюоресцентного окрашивания полученных колоний гонококков. Замедленный метод позволяет выявить небольшое количество гонококков, особенно при хронических формах гонореи.



Рис. 31. Уретра. Гонококки внутриклеточные. Окраска метиленовым синим. $\times 1000$

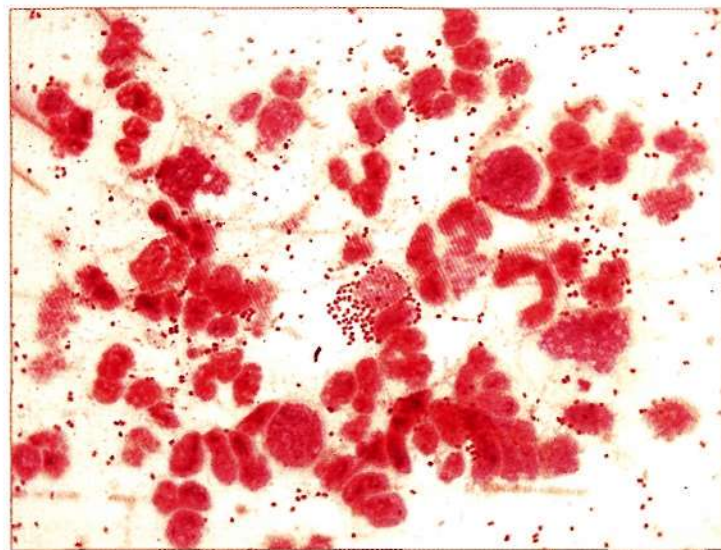


Рис. 32. Уретра. Гонококки внутриклеточные. Окраска по Граму. $\times 1000$

Урогенитальный хламидиоз

Хламидиоз представляет собой группу инфекционных заболеваний, сходных по этиологии и патогенезу, но крайне разнообразных по локализации и клиническим проявлениям. Доля хламидиозов в структуре инфекционной патологии человека неуклонно растет, особенно быстро увеличивается частота поражений половой сферы, вызванных генитальными штаммами этого патогена, что влияет на уровень репродуктивного здоровья и воспроизводство населения. По данным ВОЗ, заболеваемость населения планеты урогенитальным хламидиозом составила в 90-х годах XX века 27,1%.

Строение хламидий

Возбудители хламидиоза – мелкие, в большинстве своем грамотрицательные кокковидные бактерии размером 0,2–1,5 мкм. Необходимо дифференцировать элементарные тельца (ЭТ) с размерами от 0,2 до 0,4 мкм и ретикулярные тельца (РТ) – диаметр от 0,6 до 1,5 мкм. ЭТ могут быть округлые (*Chlamydomphila psittaci* и *Chlamydia trachomatis*) или грушевидные (*Chlamydomphila pneumoniae*).

Все хламидии имеют общий групповой, родоспецифичный антиген – липополисахаридный (ЛПС) комплекс, активной частью которого является 2-кето-3-дезоксиктановая кислота. Специфические антитела против этого комплекса используются при диагностике хламидийной инфекции иммунофлюоресцентным методом.

Цикл развития хламидий

Хламидии, имея все основные признаки бактерий, вместе с тем существенно отличаются от них благодаря уникальному двухфазному жизненному циклу. Он протекает в цитоплазматической вакуоли эукариотической клетки-хозяина и заключается в закономерной смене вегетативных репродуцирующихся крупных неинфекционных РТ и небольших плотных спороподобных ЭТ, являющихся инфекционной формой микроорганизма.

Цикл развития хламидий продолжается 48–72 часа (в зависимости от штамма микроорганиз-

ма, состояния клетки-хозяина и внешних условий) и включает несколько этапов (рис. 33).

Сначала происходит специфическая адгезия элементарного тельца хламидий на клеточной мембране чувствительной клетки и его эндоцитоз. Для эпителиальных клеток, фагоцитирующих ЭТ и не являющихся специализированными фагоцитами, характерна инвагинация участка клеточной мембраны с адсорбированным ЭТ в цитоплазму и образование фагоцитарной вакуоли. Однако в отличие от обычного бактериального фагоцитоза хламидии способны ингибировать слияние лизосом с фагосомой в клетке-хозяине. Это препятствует реализации лизосомальной активности клетки и деструкции элементарных тел, способствуя внутриклеточному выживанию возбудителя. Через 8–12 часов после проникновения в клетку ЭТ вступают в продуктивный цикл развития: в фагосоме они реорганизуются в веге-

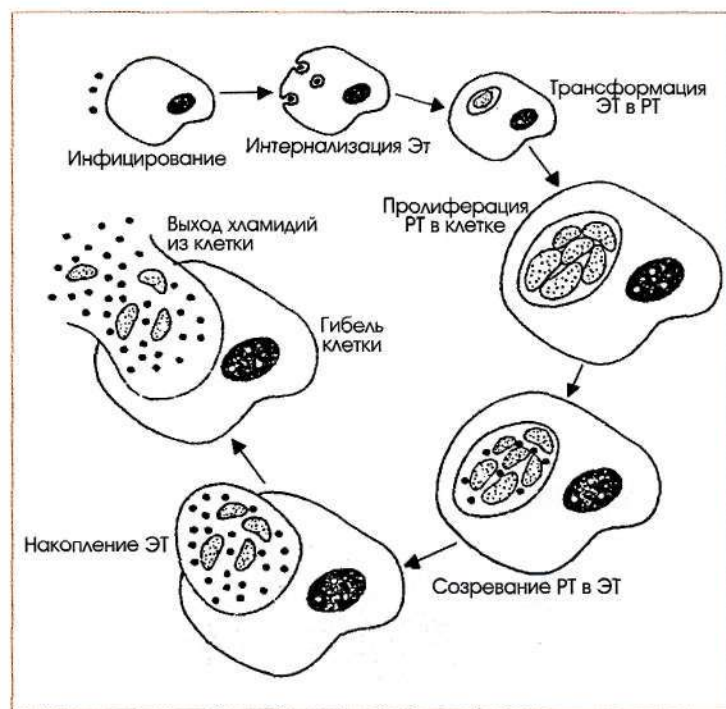


Рис. 33. Схема внутриклеточного развития хламидий. Хламидии трансформируются между 2 формами: элементарные тельца (ЭТ) и ретикулярные тельца (РТ). ЭТ – инфекционная внеклеточная форма, метаболически неактивная. ЭТ прикрепляется к эпителиальной клетке и проникает внутрь ее, формируя фагосому. Внутри фагосомы ЭТ трансформируется в более крупное метаболически активное неинфекционное РТ, которое делится бинарно, трансформируясь в ЭТ, высвобождаемые при гибели клетки

тативную форму – ретикулярные тельца (РТ). РТ размножаются путем бинарного деления и образуют «микрocolонии» – цитоплазматические включения, известные под названием телец Провачека–Хальберштедтера (рис. 34).

Через 20–48 часов после инвазии ЭТ в клетку начинается процесс трансформации РТ в ЭТ. Мембрана хламидийной вакуоли разрывается, хламидии выходят в окружающую среду, ЭТ инфицируют новые клетки, а клетка-хозяин погибает. Часто выход ЭТ из клетки-хозяина после завершения процесса экзоцитоза может быть неполным. В этом случае клетка содержит атипичные по морфологии – так называемые «пустые» цитоплазматические включения, при этом хламидии подавляют жизнеспособность клетки-хозяина, сохраняя ее на определенном минимальном уровне для поддержания своего существования.

Под влиянием трансформирующих агентов (пенициллин, цефалоспорин, низкие концентрации γ -глобулина, фактор некроза опухолей и др.) в цитоплазматическом включении клетки-хозяина появляются аномальные формы хламидий, морфологически сходные с L-формами бактерий. Удаление трансформирующих агентов отчасти приводит к нормализации структуры хламидий, т. е. происходит их реверсия. L-формы могут персистировать в клетке на протяжении ее жизненного цикла и передаваться дочерней клетке вмес-

те с цитоплазматическим включением. Подобная трансформация может быть одной из причин возникновения персистентной хламидийной инфекции. В таком состоянии микроорганизм становится наименее чувствительным к действию антибиотиков.

Ввиду общности путей передачи возбудителей при ИППП хламидии часто находятся в ассоциации с другими микроорганизмами. Это могут быть гонококки, трихомонады, неспецифическая флора (мелкие грамотрицательные палочки и грамположительные кокки), уреаплазмы, грибы и другие патогенные и условно-патогенные возбудители. При этом удлиняется инкубационный период заболевания, усиливается тяжесть клинических проявлений, чаще развиваются персистирующие формы и рецидивы хламидийной инфекции. Например, гонококковый эндотоксин оказывает токсическое действие на лейкоциты, способствующее нарушению их переваривающей способности; мелкая бациллярная грамотрицательная флора оказывает повреждающее действие на эпителиальные клетки и тем облегчает проникновение других инфекционных агентов внутрь клеток и т. д. Особый интерес представляет хламидийно-трихомонадная инфекция. Учитывая, что питание трихомонад происходит путем эндоосмоса, поглощение клеток, в том числе и микроорганизмов, не всегда сопровождается их перевариванием. При этом микроорганизмы сохраня-

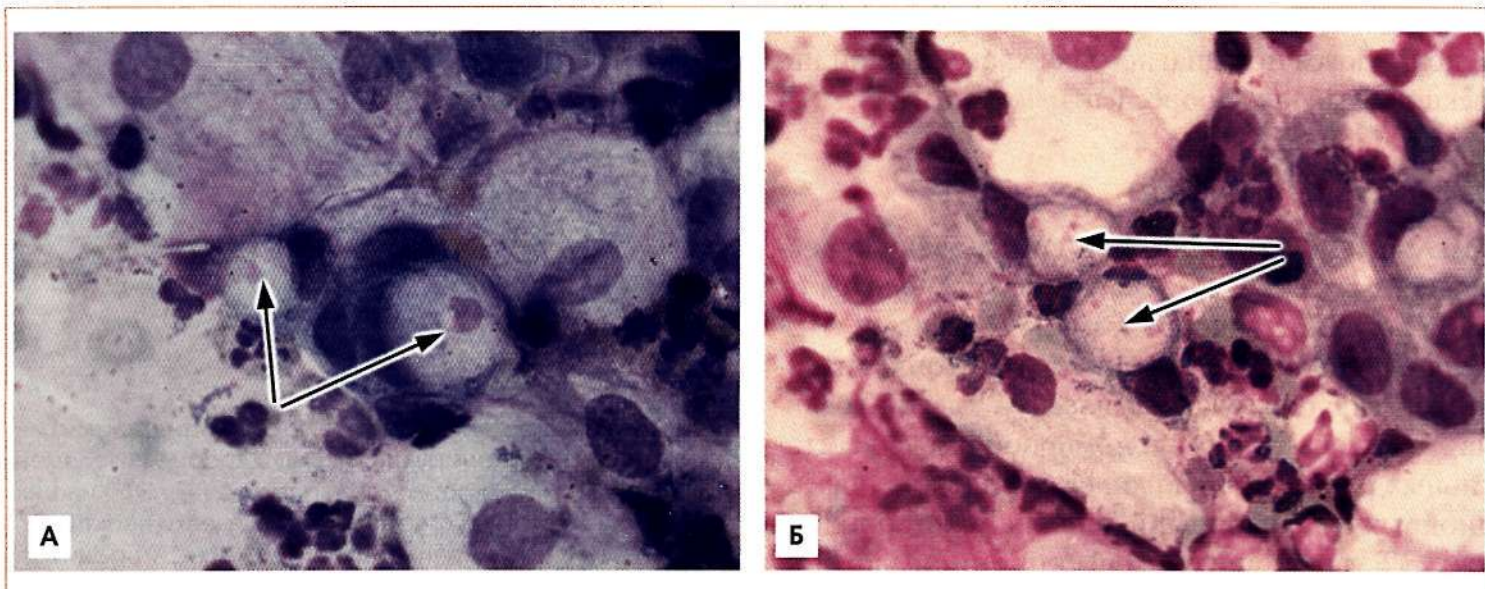


Рис. 34. Хламидийный уретрит. Эпителиальные клетки с цитоплазматическими включениями. Окраска по Романовскому–Гимзе. $\times 1000$

ют внутри трихомонад свою жизнеспособность и способны проявлять свое патогенное действие после гибели последних. В таких случаях часто наблюдается формирование L-подобных форм хламидий и развитие рецидивов хламидийной инфекции.

Фаза жизненного цикла хламидий в организме больного устанавливается путем определения в сыворотке крови последовательно синтезируемых специфических иммуноглобулинов классов М, А и G, наличие и концентрация которых указывают на конкретную стадию инфекционного процесса. Так, диагностически значимый уровень противохламидийного IgM выявляется, начиная с 5-го дня болезни. В последующем его продукция в крови нарастает, достигая максимума к 8–10-му дню болезни. После этого концентрация IgM начинает снижаться и появляется IgA – примерно с 10-го дня болезни. В течение короткого периода времени (14–20-й день болезни) у больного могут одновременно определяться два типа АТ – IgM и IgA. Этот период свидетельствует о разгаре инфекционного процесса. Далее в сыворотке происходит постепенное нарастание концентрации IgG и резкое снижение уровня IgM. Диагностически значимый уровень IgG в крови регистрируют после 21-го дня болезни. Одновременное обнаружение диагностически значимых титров IgA и IgG в сыворотке указывает на развернутую стадию острого процесса, обострение хронического или реинфицирование пациента. При сформировавшемся хроническом процессе уровни IgA и IgG могут оставаться примерно на одной величине неопределенно долгое время.

Длительно циркулирующие в крови IgG в низком «пограничном» титре свидетельствуют о хронизации процесса или указывают на давно перенесенную инфекцию.

Для характеристики местного хламидийного процесса целесообразно определение в отделяемом из уретры секреторных иммуноглобулинов, особенно sIgA, который обладает способностью ингибировать адгезию микроорганизмов на поверхности эпителиальных клеток. Его присутствие считают благоприятным диагностическим показателем.

Иммунитет после перенесенной хламидийной инфекции – видоспецифический, ненапряженный и непродолжительный, что может отчасти объяс-

няться преимущественным инфицированием лиц с иммунодефицитными состояниями (возрастные, экологически обусловленные и т. д.). Иммунореактивность при хламидиозе чаще носит ослабленный, ввиду внутриклеточной локализации возбудителя, характер, так как отсутствует полноценный контакт возбудителя с иммунокомпетентными клетками.

Клинические проявления хламидийной инфекции

В настоящее время насчитывается более 20 нозологических форм, связанных с хламидийной инфекцией. Урогенитальный хламидиоз характеризуется отсутствием каких-либо специфических проявлений и выраженной клинической симптоматики с момента заражения. Заболевание, как правило, протекает мало- или асимптомно. Манифестные формы заболевания регистрируются только в том случае, когда имеет место ассоциированная инфекция, поэтому пациент, как правило, обращается к врачу на стадии осложнений урогенитального хламидиоза. Так как момент инфицирования хламидиями установить практически невозможно, то деление заболевания на острую и хроническую стадии представляется весьма условным.

Согласно Международной классификации болезней (МКБ-Х) у мужчин выделяют следующие клинические формы урогенитального хламидиоза органов малого таза и других отделов мочеполовой системы:

- Цистит.
- Уретрит.
- Простатит.
- Эпидидимит.
- Орхоэпидидимит.
- Везикулит.
- Орхит.

Хламидийная инфекция у мужчин может вызывать вторичное бесплодие, инициируя нарушение сперматогенеза, что проявляется в снижении концентрации сперматозоидов (олигозооспермия), их подвижности (астенозооспермия) и появлении морфологически аномальных форм (тератозооспермия). При генерализации процесса может наблюдаться синдром Рейтера.

Диагностика урогенитального хламидиоза

Многообразие методических возможностей, с одной стороны, способствует повышению ка-

чества диагностики, с другой – приводит к различной трактовке специалистами данных обследования пациентов. В последние десятилетия существенно увеличилось количество людей с нарушениями иммунной системы. Это неизбежно приводит к росту атипичных проявлений хламидиоза и особенно его субклинических и бессимптомных форм. Поэтому отсутствие клинических проявлений не всегда может служить признаком «излеченности» пациента.

Алгоритм обследования пациентов с урогенитальным хламидиозом:

1. Первичный осмотр больного, взятие материала для исследования – получение соскобов с пораженных участков слизистой.
2. Использование скрининговых тестов – цитологического (окраска по Романовскому–Гимзе) или иммунохимических экспресс-тестов для постановки предварительного диагноза.
3. Использование подтверждающих методов – иммунофлюоресценции, ИФА, других серодиагностических методов, ПЦР, бактериального посева на культуру клеток (HELA) с идентификацией возбудителя и определением его чувствительности к антибактериальным препаратам – для уточнения диагноза.
4. Установление клинического диагноза и назначение курса лечения.
5. Проведение контроля излеченности (не ранее чем через 3–4 недели после окончания курса лечения).

Техника взятия материала для исследования

Правильное получение материала для исследования – залог успеха в диагностике внутриклеточной хламидийной инфекции. Основную сложность представляет, как показывает практика, получение соскобов со слизистой оболочки различных отделов урогенитальной системы. Для этого врачу-клиницисту необходимо использовать специальные зонды. Полученный при соскобе материал наносят на луночные стекла (рис. 35 и 36).

Взятие соскобов необходимо осуществлять специальными стерильными зондами под контролем микроскопии. Тем же зондом полученный материал наносят на дополнительное предметное стекло, окрашивают по методу Романовского–

Гимзы и оценивают правильность получения материала по присутствию цилиндрического эпителия, отсутствию большого количества лейкоцитов, эритроцитов и бактерий. Соскобы необходимо получать у мужчин со слизистой уретры, при необходимости – из аноректальной области и зад-



Рис. 35. Стерильные зонды для получения соскобов со слизистой

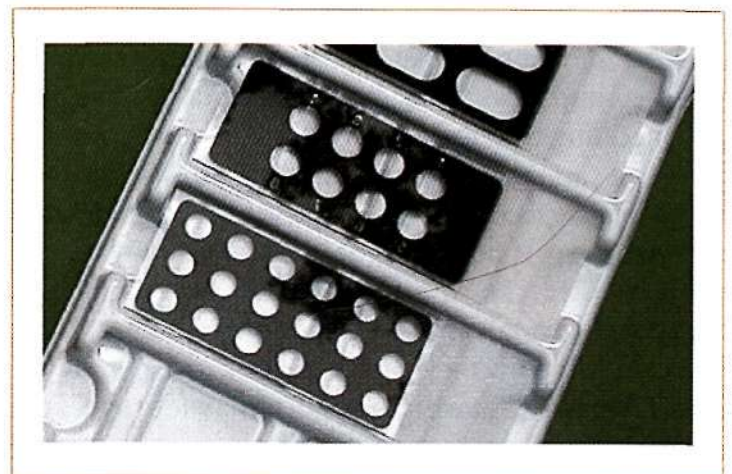


Рис. 36. Луночные стекла, на которые тонким слоем наносят материал, полученный при соскобе со слизистой

ней стенки глотки. Проводится также исследование секрета простаты.

Особенности получения соскоба из уретры у мужчин:

- специальный зонд вводится на глубину 1,5–2 см; рекомендуется повернуть его несколько раз вокруг своей оси;
- для цитологического и ПИФ-исследования полученный материал наносят на предметное и луночное стекло;
- при исследовании материала методом ПЦР, ИФА для обнаружения антигенов хламидий и культурального исследования соскоб помещают в соответствующую емкость с транспортной средой.

Немаловажными в преаналитическом этапе являются хранение и доставка полученного биологического материала. Как правило, эти этапы выполняет персонал лечебных учреждений, в то время как дальнейшая обработка материала осуществляется в специализированных лабораториях.

При подозрении на хламидийную инфекцию лабораторная диагностика может осуществляться в двух основных направлениях:

- обнаружение в исследуемом материале возбудителя, его антигенов, антител или специфических фрагментов ДНК;
- выявление специфических изменений иммунологического статуса макроорганизма, обусловленных персистенцией возбудителя или же перенесенной инфекцией.

Сказанное выше достижимо при использовании следующих методов исследования:

- *микроскопии* (световой, люминесцентной, электронной);
- *культуральной диагностики*, основанной на выделении чистой культуры возбудителя, ее идентификации и определении чувствительности к антибиотикам;
- *иммуноферментного анализа (ИФА)*, основанного на обнаружении в сыворотке крови специфических антител к антигенам наружной стенки хламидий и определении динамики изменения их титров;
- *молекулярно-биологического, чаще ПЦР-исследования*, основанного на обнаружении специфических фрагментов ДНК-возбудителя.

Выбор метода исследования осуществляется, исходя из клинической формы заболевания, с учетом степени генерализации процесса, характера течения заболевания (острое, подострое, хроническое), цели обследования (лабораторное подтверждение диагноза или массовое скрининговое обследование группы риска), материально-технической базы и наличия квалифицированного персонала.

Диагностика хламидийной инфекции базируется на данных лабораторных исследований. Однако ни один из применяемых методов не может дать исчерпывающего ответа в силу тех или иных причин, поэтому наиболее целесообразным в диагностике этой инфекции является применение нескольких методов, позволяющих выявить возбудителя, определить стадию процесса и чувствительность к антибиотикам. Изучение иммунного статуса пациента позволит обоснованно выбрать эффективную иммунокорригирующую терапию.

При повторном обследовании пациента любым из перечисленных выше методов взятие материала должно производиться не ранее чем через 3–4 недели после окончания курса лечения.

Особенности получения секрета простаты:

- обработать головку полового члена стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором;
- произвести массаж простаты через прямую кишку с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке;
- полученный секрет нанести на предметное или луночное стекло.

Для цитологического или ПИФ-исследования материал высушивают на воздухе, затем в специальной плотно закрытой емкости фиксируют в охлажденном ацетоне или 96% этиловом спирте не менее 10 минут. Обработанный таким образом препарат может храниться при комнатной температуре или в холодильнике при 4 °С без доступа влаги и прямого солнечного света неограниченно долгое время.

Для проведения цитологического исследования мазки окрашивают азуран-эозином по стандартной методике Романовского–Гимзы. Для проведения иммунофлюоресценции мазки обрабатывают ФИТЦ-мечеными антителами (флюоресцентный краситель) по прилагаемой в диагнос-

тическом наборе инструкции и просматривают при увеличении $\times 400$ – 600 без иммерсии или с водной иммерсией на люминесцентном микроскопе (рис. 37).



Рис. 37. Хламидийный уретрит. Элементарные и ретикулярные тельца. Флюоресцентный краситель. $\times 400$

Мочеполовой трихомониаз у мужчин

Урогенитальный трихомониаз – широко распространенная протозойная инвазия, передаваемая преимущественно половым путем, вызывается простейшим – *Trichomonas vaginalis*. По данным ВОЗ, оно занимает первое место по заболеваемости среди ИППП (51,2%).

Характеристика трихомонад

Трихомонады – это жгутиковые простейшие, из 3 видов, поражающих людей, патогенными являются только *T. vaginalis*, которые вызывают мочеполовой трихомониаз.

T. vaginalis имеют грушевидную форму, короткую ундулирующую мембрану и 4 расположенных спереди жгутика. Длина их обычно составляет 15–20 мкм, но может варьировать от 8 до 24 мкм. Отмечают, что при остром заболевании чаще обнаруживают мелкие особи – 8–11 мкм, а при хроническом – величина их значительно возрастает – 30–45 мкм. Трихомонады активно подвижны в результате движения жгутиков и ундулирующей мембраны. Для этих паразитов характерны колебательные или вращательные движения. Они также могут образовывать широкие псевдоподии, которые обеспечивают им амебoidное передвижение. Описаны три морфологических варианта трихомонад: жгутиковые, круглые и амебoidные. Безжгутиковые формы еще называют амастиготными формами. У амебoidных трихомонад резко увеличена фагоцитирующая

активность и повреждающее действие на эпителий, фибробласты, макрофаги и другие клетки, они обладают повышенной адгезивной способностью и выраженной цитотоксичностью. Особенности морфологических вариантов трихомонад проявляются на разных стадиях заболевания. Жгутиковые – наиболее подвижны и контагиозны. Питаются преимущественно местной микрофлорой. Круглые формы появляются при неблагоприятных условиях обитания (например, очень часто именно такие формы присутствуют в культуральных средах, что вызывает ложноотрицательный результат при неправильной трактовке). Амебoidные формы – предположительно наиболее патогенные, так как выделяя гиалуронидазу, вызывают разрыхление эпителиального слоя, его десквамацию и эрозирование. При этом трихомонады проникают в толщу эпителия, заполняя межклеточное пространство. Токсина трихомонады не образуют. Одной из «коварных» особенностей трихомонад является их резервуарная функция – способность укрывать других возбудителей, например гонококки (рис. 38), от воздействия специфических лекарственных препаратов. Поэтому лечение сочетанной (микст) инфекции, например трихомониаза и гонореи, необходимо начинать с лечения трихомониаза. Кстати, этим же объясняются случаи, когда после лечения трихомониаза выявляются другие ИППП.

Вне человеческого организма трихомонады быстро теряют жизнеспособность: на них губи-

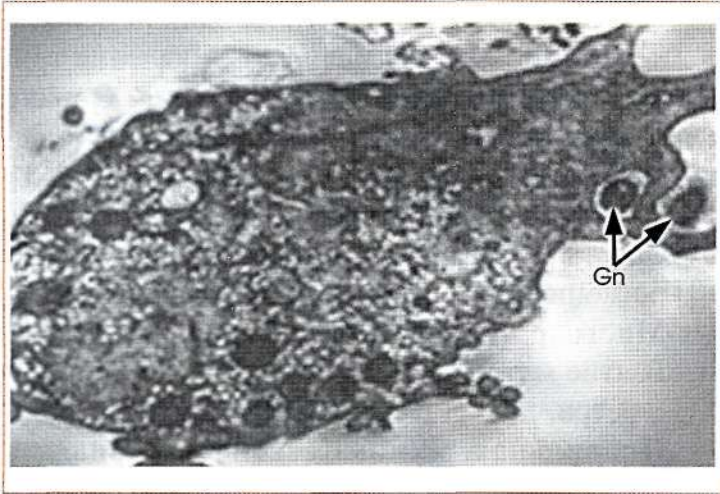


Рис. 38. Гонококки (Gn) внутри трихомонады

тельно действует температура выше 40° , прямые солнечные лучи и т. д. Вместе с тем трихомонады способны пережить от нескольких минут до часов в воде, на предметах гигиены, что не исключает бытового пути инфицирования.

Проявления трихомониаза

T. vaginalis (urogenitalis) вызывают заболевание и у мужчин, и у женщин. Заболеваемость варьирует в значительной степени, но может быть весьма высокой в некоторых группах населения (до 40% и выше), особенно при несоблюдении правил личной гигиены. У мужчин заболевание нередко бывает транзиторным, асимптомным, диагностируется труднее, а потому регистрируется гораздо реже, чем у женщин. Передача инфекции происходит, как правило, при половом контакте, однако может происходить через загрязненные предметы личной гигиены и медицинский инструментарий.

В мочеполовых органах трихомонады могут вызывать более или менее выраженную воспалительную реакцию, особенно при наличии большого количества паразитов, но часто их присутствие не сопровождается какими-либо симптомами (асимптомная инфекция). Иногда паразиты в гениталиях, особенно у мужчин, погибают сразу же или через непродолжительное время (транзиторное носительство). Возможно, в этом играют роль некоторые случайные обстоятельства: механическое удаление мочой не успевших фиксироваться к эпителию трихомонад,

присутствие химических веществ, ингибирующих развитие паразитов и т. д. Не исключается иммунная невосприимчивость некоторых лиц.

На патогенность трихомонад оказывают влияние такие факторы, как интенсивность инфекции, рН секретов, физиологическое состояние слизистых оболочек мочеполовой системы, состав сопутствующей микрофлоры. У мужчин трихомонады могут распространяться по слизистой оболочке уретры, проникают в ее железы и лакуны. Из-за частоты инвазирования предстательной железы трихомонадами Crowley (1964) предложил называть их *T. prostatialis*. Инвазироваться трихомонады также могут в семенные пузырьки, придатки яичек, купферовы железы.

Свежий трихомонадный уретрит может протекать остро, подостро или торпидно, ничем не отличаясь от уретритов другой этиологии. Слизистые оболочки могут быть воспалены, болезненны, эрозированы и нередко покрыты пенистым желтым или желтоватым отделяемым. У 10% инфицированных мужчин появляется скудное уретральное отделяемое белого цвета. Обильные выделения при острой и подострой формах уретрита уменьшаются за 1–2 недели, и заболевание становится малосимптомным, иногда интермиттирующим. Если у больного не произойдет самоизлечения, то уретрит принимает хронический характер. Для такого течения характерны периодические обострения, длительность заболевания может составлять несколько лет.

Воспалительный процесс недолго ограничивается передней уретрой, он может распространяться на луковичную и простатическую части мочеиспускательного канала. Так как в уретре паразиты иногда исчезают спонтанно или после местной терапии, то возможно возникновение изолированных трихомонадных парауретритов, простатитов, баланопоститов и др. При затяжном течении возможно образование одиночных или множественных стриктур уретры.

Простатит обычно развивается по типу первично-хронического воспаления, катарального, фолликулярного или паренхиматозного. Процесс малосимптомный, может иметь очень длительное течение, трихомонады при этом сохраняют патогенность, обуславливая инфицирование партнерши при половом контакте. Простатит регистри-

руется примерно у 40% мужчин, больных трихомониазом.

Эпидидимит чаще всего имеет подострое или острое течение, сопровождается воспалением придатка с дегенерацией эпителия канальцев и инфильтрацией субэпителиальной и межуточной ткани. Чаще процесс бывает односторонним, может быть выраженный болевой синдром и температурная реакция.

Везикулит, как правило, сопутствует простатиту или эпидидимиту, протекает обычно бессимптомно, иногда возможно появление гемоспермии. Также бессимптомно протекают и купериты.

Трихомонады практически не вызывают иммунного ответа или вызывают слабоманифестные симптомы (Васильев М.М., 1990). Трихомонады сохраняют жизнеспособность внутри макрофага, антитела только свидетельствуют об инфекции, не обеспечивая защиты, хотя возможны случаи иммунологической невосприимчивости к трихомониазу.

Лабораторная диагностика трихомониаза

Диагноз уrogenитального трихомониаза устанавливается при обязательном обнаружении *Trichomonas vaginalis (urogenitalis)* путем лабораторного исследования. У мужчин исследованию подвергают отделяемое уретры, эякулят и секрет простаты.

Для лабораторной диагностики трихомониаза применяют следующие методы:

- микроскопия нативного и/или окрашенного по Романовскому–Гимзе или 1% раствором метиленового синего препаратов;
- микроскопия препарата, окрашенного по Граму (последняя окраска одновременно позволяет идентифицировать *N. gonorrhoeae*);
- иммунофлюоресценция, ПЦР, культуральная диагностика;
- серодиагностика из-за противоречивости результатов не получила пока практического применения, хотя коммерческие тест-системы для определения вида и количества антител существуют.

У мужчин обнаружение трихомонад представляет определенную трудность, так как обычно они имеются в небольшом количестве и часто в малоподвижной амeboидной форме.

Следует подчеркнуть, что ни один из используемых методов не обеспечивает выявления трихомонад во всех случаях заболевания. Однако культуральный метод значительно повышает надежность диагностики.

Залогом успешной диагностики служат:

- Сочетание различных методов (например, микроскопия окрашенных препаратов и посева).
- Многократное повторение анализов.
- Взятие материала из разных очагов инвазии (уретра, предстательная железа, сперма).
- Правильная техника взятия материала и транспортировки в лабораторию.
- За 3 дня до исследования больные не должны применять протистоцидные средства, какие-либо местные процедуры и другие лечебные средства.

При микроскопии трихомонады достаточно легко распознаются в нативном препарате спермы, несмотря на активное движение сперматозо-

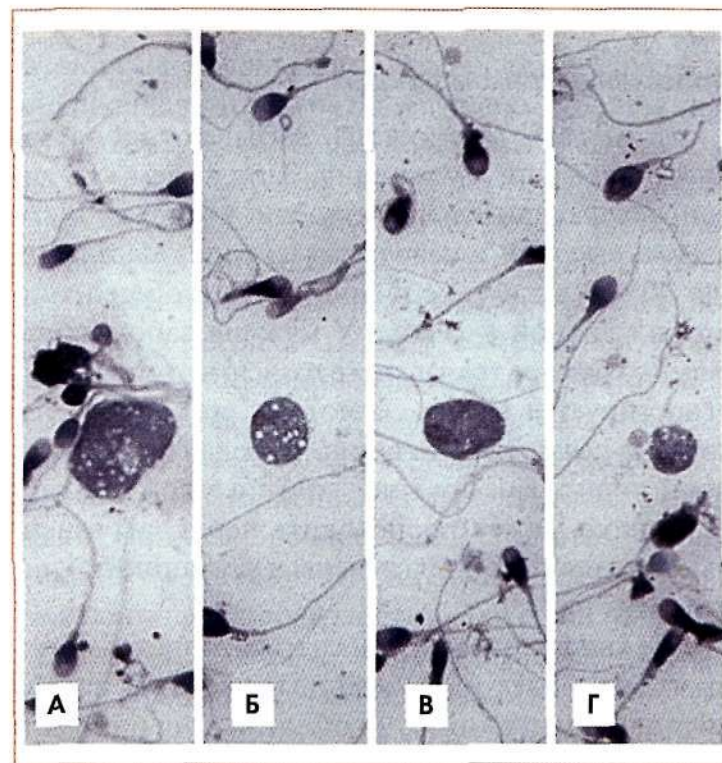


Рис. 39. Вегетативные формы *Trichomonas urogenitalis* на четырех фрагментах микрофотографий, в центре поля зрения, на фоне сперматозоидов. Это клетки разных размеров с типичными хроматиновой структуры светло-фиолетовыми ядрами, напоминающими по форме косточку сливы. Ядра расположены эксцентрично, цитоплазма сероголубая мелковакуолизированная. Трихомонады в сперме отличаются от вагинальных трихомонад меньшими размерами. Препараты окрашены азур-эозином. $\times 1000$

идов. Трихомонады – крупные клетки, их диаметр в 1,5–3 раза больше диаметра нейтрофила. Более четко строение трихомонад можно определить в препаратах, окрашенных азур-эозином. Это клетки неправильной округлой формы. В переднем конце тела клетки расположено вытянутое, в виде косточки сливы ядро с четкой хроматиновой структурой, коричневато-вишневого цвета. Цитоплазма клетки окрашивается в серовато-голубоватый цвет и может содержать мелкие вакуоли. Иногда у трихомонад окрашиваются в малиновый цвет жгутики (рис. 39).

При цитологическом исследовании окрашенных препаратов из уретры при трихомониазе можно выделить следующие особенности:

- присутствует значительное количество макрофагов;
- количество лейкоцитов в препарате может значительно варьировать, вплоть до полного их отсутствия;

- сопутствующая бактериальная флора не обильна, так как служит питательным субстратом для трихомонад.

Культуральные исследования

T. vaginalis можно культивировать в различных жидких и плотных искусственных (бесклеточных) питательных средах, а также в тканевых культурах и на куриных эмбрионах. С успехом могут использоваться питательные среды, предназначенные для культивирования кишечных амёб.

Для хорошего роста *T. vaginalis* необходимы среды с более сложным химическим составом. Одной из наиболее пригодных для этого сред является печеночная среда с цистеином, пептоном и мальтозой. Хорошие результаты получены при применении среды «Vagicult» (Финляндия).

T. vaginalis хорошо растут в анаэробных условиях, хуже – в условиях аэробноза. Оптимум pH среды 5,5–6,0, оптимальная температура 35–37°.

Герпесвирусные инфекции

Герпесвирусные инфекции – это группа инфекционных заболеваний, вызываемых самыми распространенными вирусами человека (семейство *Herpesviridae*). В семейство герпеса входят около 100 вирусов, имеющих широкий круг хозяев и подразделяющихся на 3 подсемейства – α , β , γ , из которых 8 вирусов патогенны для человека. Вирусы объединены в одно семейство на основании сходства в строении вирусной частицы (вирусная частица имеет дополнительную внешнюю липопротеиновую оболочку) и ее генома (двунитчатая молекула ДНК). Деление на подсемейства обусловлено типом клеток, вовлекаемых в инфекционный процесс, персистенцией у естественных хозяев, а также патогенным действием вируса на макроорганизм.

Вирус проникает в клетку путем эндоцитоза. Слияние цитоплазматической мембраны и эндоцитарной вакуоли сопровождается удалением липопротеидной оболочки и освобождением нуклеокапсида, который транспортируется в ядро. В ядре ДНК вируса депротенинируется, подвергается транскрипции и репликации. Через два часа после заражения в цитоплазме пораженных клеток происходит синтез большого

количества (50–70) вирусспецифических белков, которые делятся на 2 типа – структурные и неструктурные, а каждый тип в свою очередь по времени синтеза в ходе инфицирования – на сверхранные, предранные, ранние и поздние. Каскад синтеза белков завершается сборкой вирусных частиц, которая происходит как в ядре, так и в цитоплазме пораженных клеток. Спустя 10 часов от момента инфицирования вирусные частицы экспрессируются на их поверхности.

Передача инфекции осуществляется контактно-бытовым, половым, воздушно-капельным и трансфузионным путем. Возможно антенатальное и пренатальное заражение плода от больной матери.

Наиболее изучены вирусы простого герпеса 1 и 2 (ВПГ-1 и ВПГ-2), поражающие кожу и слизистые. У первично инфицированных лиц в 80–90% случаев инфекция протекает в латентной форме, а 10–20% больных имеют клинические проявления. Вторичная (рецидивирующая) ВПГ-инфекция развивается в любом возрасте, как правило, на фоне снижения иммунореактивности организма и при наличии противовирусных антител, что обуславливает слабовыраженную клиническую

симптоматику. Около 90% городского населения во всех странах мира инфицировано одним или несколькими серовариантами вируса герпеса. Заболевания, вызываемые герпесом, носят оппортунистический характер, т. е. рецидивируют в условиях иммунодефицита, гормональных сдвигов, стресса. В то же время другие заболевания на фоне герпетической инфекции протекают тяжелее и чаще рецидивируют.

Для генитального герпеса характерны следующие клиничко-морфологические проявления. Заболевание развивается после контакта с инфицированным лицом. Инкубационный период продолжается в среднем 5–7 дней и заканчивается появлением болезненных пузырьков, расположенных обычно в области наружных и/или внутренних половых органов. У мужчин герпетические высыпания чаще носят ограниченный характер. Сгруппированные пузырьки с прозрачным содержимым размером 1,5–2 мм в диаметре превращаются в пустулы, быстро разрываются, образуя эрозии, иногда язвы, эпителизация их наступает спустя 15–20 дней. У больных может быть лихорадка и другие симптомы общей интоксикации. Типичные поражения у мужчин располагаются в уретре, на головке и теле полового члена, внешней борозде, в перианальной области. Реже высыпания появляются на мошонке, в промежности, на бедрах или ягодицах. Может встречаться форма, при которой больные отмечают лишь наличие зуда. Раздражение парасимпатических волокон вызывает субъективное ощущение в виде жжения, ломоты и распирания. Характер болей может быть самым различным: мозжащие боли – в области крестца, распирающие – в зоне проекции сигмовидной и толстой кишок, которые иногда сопровождаются тенезмами и метеоризмом; у мужчин отмечаются ноющие боли в области промежности, яичек, корня полового члена.

В ответ на ВПГ-инфекцию в организме человека, помимо видового и неспецифического иммунитета, развивается и специфический иммунный ответ. Полноценный специфический противогерпетический иммунный ответ формируется только при контакте иммунной системы с антигенами вируса, которые образуются при разрушении вирионов ферментами фагоцитов (цельные вирионы служат слабыми раздражителями для иммунной системы). При образовании большо-

го количества антигенных детерминант (структурные белки оболочки, капсида и ДНК конкретного вириона) организм реагирует образованием специфических антител классов IgM и IgG, а также клеток-киллеров, направленных против конкретного штамма ВПГ. IgM-антитела начинают образовываться примерно с 4-го дня после контакта с антигенами, срок их жизни составляет в среднем 7 дней. Выявление IgM свидетельствует либо о первичном остром процессе, либо о реактивации латентного хронического процесса, либо о реинфицировании. Антитела класса IgG образуются с 14-го дня, срок их жизни – 21 день. Нарастание (4-кратное) титра этих антител свидетельствует либо об остром первичном процессе, либо об обострении хронического. При повторной встрече иммунной системы с антигенами вируса (при реинфекции или реактивации) формируется вторичный ответ, который развивается гораздо быстрее, и на те же самые антигены практически сразу же образуются антитела класса IgG.

Клетки-киллеры разрушают свободно циркулирующие вирионы, оболочка которых покрыта противогерпетическими антителами.

Считают, что у всех людей, страдающих рецидивирующей герпетической инфекцией, имеется какой-либо изолированный или сочетанный дефект противогерпетического иммунитета – специфический иммунодефицит, так называемый «герпетизм». Это объясняет возможность проявления несоответствия титра антител клинической картине – отсутствие нарастания титра АТ при реактивации процесса; IgM-антитела могут обнаруживаться не только при первичной инфекции, но циркулировать в крови и более длительно, чем обычно; бессимптомное течение заболевания может сопровождаться высокими титрами АТ.

Лабораторная диагностика инфекций, вызываемых ВПГ, осуществляется с помощью цитологических, иммунофлюоресцентных, молекулярно-биологических, вирусологических исследований, а также с помощью определения антител методом ИФА.

В настоящее время «золотым стандартом» в диагностике герпетической инфекции является **выделение вируса и его типирование**. Чувствительность этого метода составляет около 80%, а специфичность – 100%, однако для получения результатов необходимо 48 часов и более.

Обнаружение антигенов проводится методом прямой иммунофлюоресценции, позволяет определить и дифференцировать ВПГ-1 и ВПГ-2, обеспечивает быстрый ответ, чувствительность 70–75%, специфичность – 90%.

Определение типа ВПГ потенциально важно для прогноза, лечения и эпидемиологической оценки, так как генитальный ВПГ-2 имеет более высокую вероятность рецидивов, чем ВПГ-1. К тому же ВПГ-1 и ВПГ-2 могут по-разному отвечать на противовирусные препараты.

Цитологический метод. На ранних стадиях болезни в мазках из пораженных участков, окрашенных по Романовскому–Гимзе, обнаруживают гигантские многоядерные клетки. Ядра в этих клетках могут несколько отличаться по размерам, при этом они подстраиваются друг к другу с образованием «фасеток». Структура хроматина мелкозернистая, «смазанная», контуры ядер четкие. Характерным признаком герпетической инфекции является то, что структура хроматина одинакова во всех ядрах многоядерной клетки. Цитоплазма плотная, блестящая, с признаками дискератоза (рис. 40). Однако этот метод не позволяет определить тип вируса.

Обнаружение вирусного генома наиболее часто проводится методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод высокочувствителен (95%) и специфичен (90–100%). Рецидивирующий герпес характеризуется продромальной стадией, в которой можно выявить ДНК в клинических образцах.

Иммуноферментный анализ. Метод ИФА позволяет определять ответ организма (синтез антител) на структурные и неструктурные бел-



Рис. 40. Герпетический уретрит. Гигантская многоядерная клетка. Окраска по Романовскому–Гимзе. $\times 1000$

ки герпесвируса. Качество тест-систем (их чувствительность и специфичность) в значительной степени определяется свойствами антигена, сорбированного на твердой фазе. Могут использоваться очищенные вирусные частицы, лизаты инфицированных клеток, смесь вирусных белков или синтетических пептидов. В зависимости от специфичности используемого конъюгата (анти-M или анти-G) можно оценивать антитела разных классов. Несмотря на возможную несогласованность между параметрами иммунного ответа и клиническими проявлениями, метод ИФА для скрининговых обследований и динамического наблюдения за пациентами наиболее приемлем из-за своей доступности и достаточной простоты.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЯКУЛЯТА

Основной целью исследования эякулята является определение способности спермы к оплодотворению и выявление заболеваний и/или патологических процессов, вызвавших поражения. В последнее время исследование эякулята проводится для значительно более широкого диапазона диагностических задач, чем это проводилось раньше, и обусловлено развитием вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Вспомогательные репродуктивные технологии позволяют в настоящее время добиться беременности в большинстве случаев нарушения фертильности спермы. В клинике проводятся: ВМИ – внутриматочная инсеминация, при которой сперма предварительно обрабатывается, чтобы увеличить концентрацию нормальных

сперматозоидов; ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение, когда у женщины изымаются яйцеклетки и помещаются вместе со сперматозоидами для наступления оплодотворения; ИКСИ (ICSI) – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида. Эта технология произвела революцию в репродуктологии, позволяя получить беременность даже при тяжелой патологии спермы. Для этого необходим один нормальный сперматозоид, который с помощью микроиглы помещается внутрь яйцеклетки. Сперматозоид (или сперматиду) можно получить при пункции яичка, если имеется обтурационная азооспермия. Полученные с помощью ЭКО или ИКСИ эмбрионы впоследствии переносятся в подготовленную матку.

Принципы исследования эякулята

Образцы эякулята могут содержать возбудителей опасных инфекций (ВИЧ, вирусы гепатита), поэтому работа с ними требует предельной осторожности:

- В отличие от большинства других биологических материалов эякулят очень чувствителен к воздействию различных факторов. Поэтому для получения максимально достоверного результата необходимо исключить или снизить вероятность воздействия всех этих факторов в период подготовки к сдаче анализа, в процессе получения эякулята и проведения лабораторного исследования.
- При интерпретации полученных результатов необходимо учитывать все негативные факторы, которые могут оказать влияние на показатели спермограммы, и базироваться на нормах, рекомендуемых ВОЗ.
- Для получения достоверных и сравнимых результатов необходима стандартизация прове-

дения исследования по времени, температуре хранения эякулята и другим параметрам.

- Разведение эякулята в физиологическом растворе и многократное пипетирование при проведении исследования являются травмирующими факторами, приводящими к нарушению подвижности и морфологии сперматозоидов.
- Бесплодие – это отсутствие беременности при регулярной половой жизни без предохранения в течение 12 месяцев. Только после этого периода стоит всерьез начинать обследовать супружескую пару по поводу бесплодного брака. Задача лаборатории – оценить (хотя бы условно) вероятность возникновения беременности от конкретного партнера. Несмотря на то что оплодотворение яйцеклетки осуществляется одним сперматозоидом, для получения беременности необходимо достаточно большое количество подвижных,

морфологически нормальных сперматозоидов, обладающих длительным сохранением подвижности.

- При исследовании эякулята необходимо помнить, что он представлен секретами яичек и группы желез, вырабатывающих семенную жидкость (простаты, семенных пузырьков, парауретральных и бульбоуретральных желез). Выброс содержимого секреторных желез и сперматозоидов из семявыносящих протоков в просвет уретры идет за счет последовательных мышечных сокращений уретры,

что приводит к перемешиванию и порционному выбросу эякулята. В первых порциях находится наибольшее количество сперматозоидов, а остальные порции «смывают» сперматозоиды со стенок уретры. Нельзя забывать, что содержимое уретры, слизь, выделения желез, клетки, слущенные со стенок, также смываются и перемешиваются в эякуляте.

- Все манипуляции с эякулятом необходимо проводить с соблюдением техники безопасности как с потенциально инфицированным биологическим материалом.

Преаналитический этап исследования спермы

Это один из самых ответственных этапов лабораторного анализа. Часто он не зависит от работы КДЛ, тем не менее за правильно проведенные подготовку пациента к сдаче анализа, процедуру получения эякулята и даже за интерпретацию полученных результатов врач клинической лабораторной диагностики отвечает так же, как и кли-

ницист, назначивший анализ. Они должны совместно правильно ориентировать пациента, знать и по возможности избегать погрешностей при исследовании эякулята. Поэтому обращаем внимание на возможные погрешности преаналитического, аналитического и послепреаналитического этапов лабораторного анализа спермы.

Подготовка пациента к проведению исследования

- При направлении пациента на спермограмму врач обязан подробно объяснить, какие условия подготовки должны быть выполнены для получения достоверного результата этого исследования.
- Эякулят должен быть получен после полового воздержания в течение не менее 2 суток и не более 7 дней. Длительные (в течение нескольких месяцев) периоды воздержания перед обследованием могут привести к нарушению эффективного процесса сперматогенеза, появлению старых, дегенеративных форм, снижению качественных параметров сперматозоидов.
- Для первичной оценки эякулята рекомендуется провести два исследования с интервалом не менее 7 дней и не более 3 недель. Если результаты двух исследований значительно отличаются друг от друга, следует провести дополнительный анализ.
- Период полового воздержания при нескольких исследованиях рекомендуется сохранять

одинаковым для снижения колебаний в показателях спермограммы.

- Несоблюдение временного интервала в половом воздержании, частые половые акты могут способствовать резкому снижению общего количества, концентрации сперматозоидов в эякуляте и их качественных параметров (подвижность, жизнеспособность). При воздержании более 6–7 дней часть сперматозоидов (наиболее «старых») сбрасывается в семенные пузырьки и погибает. Точно оценить в этом случае сперматогенную функцию паренхимы яичек оказывается невозможным.
- Не употреблять алкоголь в любых количествах в течение 6–7 дней перед исследованием спермограммы. Постараться исключить в течение 2,5 месяцев перед исследованием эякулята токсические факторы. Хронические интоксикации (алкогольная, табачная, наркотическая, производственная, лекарственная и другие) закономерно приведут к снижению качественных, а иногда и количественных

показателей эякулята. Употребление алкоголя, наркотических препаратов, некоторых лекарственных препаратов и других токсических веществ в течение 5–10 дней перед сдачей анализа способствует накоплению токсических веществ в организме и может снизить качественные характеристики сперматозоидов.

- При воспалительных заболеваниях уретры и/или простатовезикулярного комплекса рекомендуется исследовать эякулят спустя 2 недели после проведения лечения основного заболевания (для ликвидации медикаментозной интоксикации). Интоксикации на фоне острых и хронических заболеваний могут привести к снижению качественных и количественных показателей эякулята.
- Алиментарные факторы – гипотрофия, авитаминоз – могут привести к нарушению процесса сперматогенеза и недостаточной выработке полноценных сперматозоидов.
- Необходимо отказаться от исследования эякулята, если в течение 7–10 дней перед анализом были простудные или другие острые заболевания, протекавшие с лихорадкой. Гипертермия (бытовая, производственная и при лихорадящих состояниях) нарушает процесс сперматогенеза, протекающий нормально при температуре на 2–3 °С ниже температуры тела. При гипертермии могут снижаться как количественные, так и качественные показатели спермограммы. Перед исследованием эякулята необходимо отказаться

от процедур с перегреванием (УВЧ, сауны, бани).

- После массажа простаты исследование эякулята следует отложить.
- Накануне сдачи эякулята необходимо исключить тяжелые физические нагрузки, конфликтные ситуации. Ночью перед сдачей анализа рекомендуется обеспечить себе полноценный отдых. Физическая усталость (работа в ночную смену, тяжелые физические нагрузки, бессонная ночь накануне сдачи анализа эякулята) может привести как к нарушениям процесса получения эякулята, так и к снижению качественных параметров сперматозоидов.
- Психоэмоциональный дискомфорт (подавленное, раздраженное состояние или отвлекающее влияние окружающих, некомфортные условия места сбора эякулята) может привести к нарушению процесса получения эякулята.
- Отсутствие опыта мастурбации иногда приводит к затруднениям (вплоть до полной невозможности) в получении эякулята. Однако большинство мужчин, не имеющих мастурбационного опыта, получают нормальный эякулят для исследования.
- Возможность умышленного нарушения условий подготовки для получения негативных результатов сперматологического исследования (при судебных исках об установлении отцовства и т. д.) обязательно должна учитываться при трактовке полученных результатов.

Получение эякулята и возможные погрешности при этой процедуре

- Эякулят получают путем мастурбации. Получение эякулята в условиях медицинского учреждения является предпочтительным, так как уменьшается вероятность повреждения сперматозоидов при транспортировке, бактериального загрязнения.
- Не рекомендуется для получения эякулята использовать прерванный половой акт, так как может быть потеряна первая порция эякулята, в которой концентрация сперматозоидов наибольшая, кроме того, кислая рН влагалища оказывает отрицательное воздействие на подвижность сперматозои-

дов, а примесь эпителиальных клеток затрудняет микроскопическое исследование материала.

- Если показано бактериологическое исследование эякулята, пациент перед получением материала должен помочиться (смыть мочой содержимое мочеиспускательного канала), а затем тщательно вымыть руки и половой член.
- Токсическое повреждение сперматозоидов может быть вызвано:
 - попаданием в эякулят кремов, вазелина, используемых при мастурбации;

- остатками дезинфицирующих и моющих средств на контейнере, предназначенном для получения и хранения эякулята;
- попаданием влагалищного содержимого в эякулят при прерванном половом акте;
- добавлением пациентом слюны или химических веществ в собранный эякулят для искусственного создания некрозооспермии и астенозооспермии.
- Неполный сбор материала может быть вызван тем, что:
 - а) часть эякулята не попала в баночку (первые капли, реже средняя или конечная порция);
 - б) умышленно взята только часть эякулята для получения негативного результата исследования;
 - в) эякуляция проведена с неполным опорожнением простаты, семенных пузырьков, придаточных половых желез, неполным выбросом сперматозоидов из семявыбрасывающего протока;
 - г) при ретроградной эякуляции (когда эякулят попадает в мочевой пузырь): при подозрении на ретроградную эякуляцию необходимо исследовать осадок посторгазменной мочи на наличие сперматозоидов.

Сбор материала для исследования

Для сбора эякулята должны использоваться одноразовые пластиковые контейнеры с завинчивающейся крышкой (рис. 41) и широким горлышком



Рис. 41. Пластиковые контейнеры, которые рекомендуются для сбора эякулята

ком (объемом не менее 50 мл) либо стеклянная емкость с крышкой (например, от детского питания), тщательно вымытая и прокипяченная в течение 10 минут. Материал, из которого изготовлен контейнер, должен быть проверен на отсутствие токсического влияния на подвижность сперматозоидов. Для бактериологического исследования необходимо использовать стерильный контейнер (рис. 42).

При невозможности сбора эякулята методом мастурбации (этические, религиозные причины) допустимо его получение в процессе полового акта с помощью специальных пластмассовых кондомов (изготовленных из пластика, не повреждающего сперматозоиды). В такой набор, помимо кондома, входит специальный контейнер с воронкой или мешочек с зажимом для дальнейшей транспортировки (например, набор фирмы «Fertipro», Бельгия). Использование обычных кондомов недопустимо, так как они содержат спермицидную смазку, влияющую на жизнеспособность сперматозоидов.

Необходимо объяснить пациенту, что материал должен быть собран полностью. Сразу же после получения эякулята пациент должен доставить полученный материал в лабораторию в тепле (при температуре тела). Во время транспортировки в лабораторию следует оберегать материал от резких перепадов температуры (ниже 20 °С и выше 40 °С), чтобы избежать отрицательного их воздействия на подвижность сперматозоидов. Эякулят следует доставить в лабораторию в те-



Рис. 42. Стерильные контейнеры для сбора эякулята. Таковую продукцию можно приобрести в компании «ГЕМ»

чение 1 часа после его получения. На контейнере указывается Ф. И. О. пациента, дата и время получения эякулята.

Посуда для получения стерильного эякулята (для бактериологического исследования) должна быть закрыта крышкой и тщательно простерилизована. Крышка с баночки снимается непосредственно перед эякуляцией. Во время получения эякулята нельзя касаться внутренней поверхности крышки и баночки во избежание попадания

грязи и микроорганизмов с кожи рук и полового члена внутрь. После эякуляции нельзя стряхивать в баночку капли эякулята, попавшие на руки или головку полового члена.

Пациент должен сообщить врачу (лаборанту) о том, что материал был собран не полностью (часть эякулята не попала в баночку), произошло неполное семяизвержение, эякуляция была получена с трудом, после длительной мастурбации (более 10 мин).

Проведение лабораторного исследования эякулята

Исследование эякулята должно проводиться специально обученным, прошедшим подготовку врачом клинической лабораторной диагностики или специально подготовленным медицинским лабораторным технологом (фельдшером-лаборантом).

Уровень и объем лабораторного исследования эякулята должны зависеть от конкретной задачи, поставленной лечащим врачом. Например, если эякулят получен для исключения воспалительных заболеваний простатовезикулярного комплекса, тогда может быть достаточным только морфологическое исследование клеточного состава с определением концентрации лейкоцитов в эякуляте.

Если эякулят в лабораторию доставляется самим обследующимся, необходимо уточнить и зафиксировать в журнале:

- точное время эякуляции;
- не было ли охлаждения эякулята при доставке в лабораторию;
- полностью ли был собран эякулят;
- длительность воздержания от предыдущего семяизвержения;
- сколько времени понадобилось для получения эякулята (более 10 мин?).

Эякулят необходимо поместить в термостат при 37 °С.

Погрешности лабораторного исследования эякулята

На лабораторном этапе исследования эякулята наиболее часто возникают следующие ошибки:

- Нарушение стандартизации температуры хранения эякулята. Чем выше температура

хранения, тем более высокие скоростные параметры наблюдаются у сперматозоидов и тем быстрее падает их подвижность и жизнеспособность при динамическом наблюдении. При снижении температуры хранения ниже 18–20 °С нарастает риск холодовой травматизации сперматозоидов (снижение/прекращение их подвижности), сначала временной, а затем и окончательной.

- Нарушение химической чистоты лабораторной посуды приводит к токсическому поражению сперматозоидов.
- Нелабораторная пластиковая посуда может обладать токсическим эффектом и создавать условия для обездвиживания и гибели сперматозоидов.
- Следует избегать исследования эякулята из кондома, так как резина кондома и спермицидная смазка практически моментально приводят к обездвиживанию и гибели сперматозоидов.
- Нарушение стандартизации времени проведения исследования с момента получения эякулята не дает возможности в дальнейшем корректно сравнивать полученные качественные параметры сперматозоидов с нормой и/или предыдущими анализами. Согласно рекомендациям ВОЗ установлено, что образец эякулята должен разжижаться в течение 1 часа, однако обычно это происходит в течение 15 мин. С целью соблюдения одинаковых условий для всех исследований и воспроизводимости для стандартизации рекомендуем проводить изучение подвижности сперматозоидов через 60 мин после получения материала.

- Испарение части семенной жидкости из широкогорлой посуды (особенно при малом объеме эякулята) приводит к сгущению эякулята, изменению концентрации сперматозоидов и их качественных параметров.
- Плохое перемешивание эякулята при взятии порции на исследование (особенно при высокой вязкости) может привести к искажению полученных как количественных, так и качественных показателей эякулята.
- Многократное пипетирование при высокой вязкости эякулята приводит к механической травматизации сперматозоидов и падению их качественных параметров.

Референтные значения показателей эякулята

Референтные значения показателей эякулята в большинстве метод-зависимые, поэтому имеются рекомендации, согласно которым «нормальные значения» устанавливаются в собственной лаборатории. Однако технология получения «собственных норм» очень сложная. В частности, для получения нормативных значений, согласно рекомендациям ВОЗ, необходимо исследовать образцы эякулята мужчин, у партнерш которых на-

ступила беременность, причем желательно в течение 12 месяцев после прекращения приема супругами контрацептивов. Необходимо исследовать достаточно большое число (1000) образцов эякулята и затем сопоставить результаты с наступлением беременности. Поэтому трудно предположить, что КДЛ самостоятельно могут получить нормальные значения эякулята. Более того, практически повсеместно не определены истинные пределы нормативных показателей эякулята. В то же время нет достаточно веских доказательств каких-либо их различий между разными этническими группами.

Приводимые в табл. 9 референтные значения эякулята основаны на рекомендациях ВОЗ, в которых подчеркивается, что эти нормы получены, исходя из клинического опыта многих специалистов. Эти показатели не являются минимально необходимыми для наступления зачатия. Мужчины, показатели эякулята у которых ниже указанных, также могут быть фертильны. Более того, стандартный параметр «концентрация сперматозоидов» является собирательным за счет функционирования двух систем – системы выработки «концентрата» сперматозоидов (яички) и жидкой части эякулята (придаточные половые железы).

Таблица 9

Референтные значения эякулята (ВОЗ, 2002)

Объем	Не менее 2 мл
Разжижение	В течение 60 мин
рН	7,2–8,0 ед.
Концентрация сперматозоидов	Не менее 20×10^6 сперматозоидов/мл
Общее количество сперматозоидов в эякуляте	Не менее 40×10^6 сперматозоидов
Подвижность	Не менее 50% подвижных (категория А + В) или не менее 25% с поступательным движением (категория А) в течение 60 мин после эякуляции
Морфология	$\geq 50\%$ с нормальной морфологией или $\geq 30\%$ с нормальной морфологией головки <i>Примечание.</i> В настоящее время во многих странах приняты «строгие критерии» нормальной морфологии сперматозоидов (см. рис. 68), которые существенно отличаются от приведенных в данной таблице (14% и более)
Жизнеспособность	$\geq 75\%$ живых сперматозоидов, т. е. сперматозоидов, не окрашенных суправитальной краской <i>Примечание.</i> В протоколе ВОЗ указано 50% или более живых, т. е. неокрашенных по Блюму сперматозоидов (в нашей стране чаще используется приведенное выше значение – 75% живых сперматозоидов)
Агглютинация	Отсутствует
Лейкоциты	$< 1 \times 10^6$ лейкоцитов/мл
MAR или IBT	Менее 50% сперматозоидов с прилипшими частицами или шариками

Поэтому он никоим образом не может быть использован как критерий оценки сперматогенеза и его нарушений, в расчет идут только выраженные отклонения от нормы (табл. 10).

Эта классификация охватывает только часть показателей, остальные приводятся в соответствующих разделах исследования эякулята. В последние рекомендации ВОЗ не вошли

Таблица 10

Классификация показателей эякулята (Eliasson et al., руководство ВОЗ, 2001)

Нормозооспермия	Нормальный эякулят в соответствии с нормативными значениями
Олигозооспермия	Концентрация сперматозоидов ниже нормативных значений
Астенозооспермия	Подвижность ниже нормативных значений
Тератозооспермия	Морфология ниже нормативных значений
Олигоастенотератозооспермия	Наличие нарушений всех трех показателей (также подходит при комбинации нарушений двух показателей)
Азооспермия	Нет сперматозоидов в эякуляте
Аспермия	Нет эякулята

некоторые термины и понятия, широко использованные ранее в отечественной практике КДЛ, такие, как дискинезия, гипер- или полиспермия, полизооспермия, акинозооспермия, некрозоо-

спермия и другие. Мы рекомендуем использовать терминологию ВОЗ для стандартизованного исследования и заключения по анализу эякулята.

Макроскопическое исследование эякулята

Общие свойства спермы

Разжижение

Сперма, полученная при эякуляции, густая и вязкая. Первоначальная коагуляция спермы в момент эякуляции, по-видимому, препятствует потере сперматозоидов во влагалище, а последующее ее разжижение обеспечивает их продвижение через шейку матки. Разжижение эякулята при комнатной температуре должно наступить в течение 60 мин, но обычно наступает через 10–30 мин. В некоторых случаях разжижения эякулята не происходит за 60 мин, этот факт необходимо отметить в бланке. Если эякулят длительное время остается вязким, полувязким или вообще не разжижается, можно думать о воспалении предстательной железы. При этом отмечается увеличение образования слизи и нарушение выделения муколитических ферментов. Вязкая консистенция спермы препятствует движению сперматозоидов, которые или не двигаются, или быстро теряют подвижность.

Осторожное непрерывное перемешивание во время разжижения эякулята уменьшает ошибки при оценке количества сперматозоидов. Образец следует перемешивать в том же контейнере, в котором он был получен, однако его нельзя трясти. Для равномерного осторожного перемешивания спермы можно использовать миксер для перемешивания крови. Для этого эякулят необходимо перелить в пробирку, закрыть ее пробкой и поместить в миксер. Если разжижения эякулята не наступило, необходимо провести дополнительную обработку образца перед анализом – добавить ферменты (например 1 г/л бромелайна или трипсин до конечной концентрации 1%). Иногда разжижения добиваются добавлением к сперме аналогичного объема питательной среды (физ. раствора) и многократным перемешиванием, повторным пипетированием (взятие и сброс эякулята из пипетки). Однако разбавление спермы может повлиять на показа-

тели семенной плазмы, подвижность и морфологию сперматозоидов.

Вязкость

Вязкость определяется через 1 час после получения эякулята. Чтобы определить вязкость разжиженного эякулята, необходимо опустить в него стеклянную палочку, а затем поднять и измерить длину образующейся нити. В норме ее длина не должна превышать 2 см. В эякуляте с повышенной вязкостью образуется нить длиной более 2 см.

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

Нормальная вязкость разжиженного эякулята не исключает наличия патологии.

Если в образце полученной спермы присутствуют тяжи слизи, вязкость оценивается в свободных от слизи участках. При определении повышенной вязкости применяются процедуры для разжижения.

Повышенная вязкость наблюдается достаточно часто (по некоторым данным, у 30–50% обследуемых) и может быть одним из факторов, препятствующих оплодотворяющей способности эякулята, снижая подвижность сперматозоидов.

Объем

В норме у здорового пациента после 4–7-дневного полового воздержания объем эякулята колеблется от 2 до 6 мл (*нормоспермия*).

Объем полученного эякулята измеряют сразу после его разжижения в доставленном контейнере, если он градуирован. Наиболее удобным является засасывание полученного эякулята в одноразовый 5–10 мл шприц с пластиковым, а не резиновым поршнем для дальнейшего хранения. Можно взвесить контейнер до и после получения эякулята (1 г соответствует 1 мл).

Уменьшение объема эякулята ниже 2 мл носит название *олигоспермии (гипоспермии)*, а полное отсутствие эякулята – *аспермии*.

Олигоспермия и аспермия наблюдаются при окклюзии семявыносящих протоков, ретроградной эякуляции, хроническом воспалении предста-

тельной железы и/или семявыносящих протоков, дефиците гонадотропных гормонов, врожденном отсутствии *vas deferens*, предстательной железы или иногда – семенных пузырьков. К уменьшению объема эякулята приводит снижение секреции предстательной железы и семенных пузырьков. Снижение объема эякулята характерно для *азооспермии* – отсутствие сперматозоидов в эякуляте, которое наблюдается при атрофии яичек или облитерации обоих семявыносящих протоков.

Запах

Эякулят имеет характерный запах, который сравнивают с запахом цветов каштанов. Этот запах он приобретает при присоединении секрета предстательной железы. При закупорке выводных протоков предстательной железы, атрофии простаты и после простатэктомии специфический запах спермы снижается или исчезает. Гнилостный запах эякулята приобретает при гнойно-воспалительных процессах в простате, семенных пузырьках и зависит от продуктов жизнедеятельности микрофлоры, вызвавшей воспалительный процесс. Гнилостный запах может появиться при длительном хранении эякулята также за счет продуктов жизнедеятельности микрофлоры.

Цвет

Описание цвета проводится сразу после разжижения или через 1 час после эякуляции.

Нормальный эякулят мутный, молочно-белого или серовато-желтого цвета, может содержать желеобразные гранулы. Степень мутности зависит от количества сперматозоидов. Если количество сперматозоидов снижено, эякулят более прозрачный. Изменение цвета спермы некоторые авторы связывают со временем воздержания и возрастом пациента. Если в эякуляте присутствуют эритроциты, образец приобретает розовый, красный или красновато-коричневый оттенок (*гемоспермия*). Желтоватый и желтый оттенок эякулята приобретает при желтухе, при приеме некоторых витаминов, флавина и длительном половом воздержании. При большом содержании лейкоцитов сперма окрашивается в желтовато-зеленый цвет (*лейкоспермия или пиоспермия*). Наличие осадка, хлопьев, взвеси расценивается как патология.

Исследование спермы с помощью тест-полосок

Ход исследования. Капля разжиженной спермы наносится на соответствующую диагностическую зону политеста для химического анализа мочи или на диагностическую зону монотеста. Изменение окраски соответствующей зоны сравнивается с цветной шкалой на контейнере для хранения полосок. Результат исследования вносится в бланк.

Гемоспермия

Сперма принимает розовую, красноватую или бурую окраску из-за присутствия крови или продуктов ее распада.

При изменении окраски спермы и подозрении на гемоспермию можно использовать диагностические полоски «сухая химия» для химического анализа мочи, позволяющие обнаружить эритроциты и гемоглобин. В присутствии свободного гемоглобина реагентная зона окрашивается в более или менее гомогенный синий или зеленый цвет. Неизмененные эритроциты проявляются интенсивно окрашенными сине-зелеными точками или пятнышками на неокрашенной реагентной зоне. Окраска оценивается полуколичественно сравнением с цветной индикаторной шкалой на тубе для тест-полосок.

Пиоспермия (лейкоспермия)

В диагностическую зону, позволяющую обнаруживать в сперме нейтрофилы, заложена реакция на эстеразы (эластазу).

В 1 мл нормального эякулята содержится максимум до 1 млн лейкоцитов, следовательно, в 1 мкл хорошо размешанного эякулята – 1000 лейкоцитов. При воспалении в эякуляте резко возрастает количество нейтрофилов, и он приобретает желтоватый или зеленоватый цвет. Нанесенный на диагностическую зону нормальный эякулят вызывает появление специфической серовато-сиреневой окраски, подтверждающей нормальное содержание нейтрофилов. Эта окраска появляется постепенно в течение 2 мин наблюдения. В зависимости от количества нейтрофилов, которое при лейко- и пиоспермии значительно превышает 1000/мкл, отмечается более яркая ок-

раска по сравнению с максимальной окраской зоны шкалы контейнера. Эта окраска появляется сразу после нанесения патологической спермы на диагностическую зону.

При острой воспалительной реакции в эякуляте нейтрофилы составляют основную массу клеток (до 100%). При переходе заболеваний в хроническую стадию на фоне нейтрофилов появляются моноциты, макрофаги и плазматические клетки – клеточные элементы, типичные для хронического вялотекущего воспалительного процесса, а при присоединении аллергического компонента – эозинофилы.

Реакция (pH)

Реакция эякулята в норме слабощелочная или щелочная, pH колеблется в диапазоне 7,2–8,0. Щелочную реакцию сперме придает секрет бульбоуретральных желез. Относительную стабильность pH семенной жидкости создают фосфаты и карбонаты, выделяемые семенными пузырьками. Постоянная слабощелочная реакция среды обеспечивает активную подвижность сперматозоидов и частично компенсирует кислую среду влагалища (pH 4,0–4,2) до проникновения сперматозоидов в цервикальную слизь (pH 5,0).

При наличии большого количества сперматозоидов pH снижается из-за интенсивного фруктолиза, сопровождающегося накоплением *in vitro* молочной кислоты.

Резкощелочная реакция спермы (pH 9,0–10,0) свидетельствует о патологии предстательной железы.

При закупорке семявыносящих протоков обоими семенными пузырьками или двустороннем врожденном отсутствии семявыносящих протоков на фоне азооспермии отмечается кислая реакция спермы (pH 6,0–6,8). Низкие значения pH (ниже 7,2) являются, как правило, косвенным признаком различных состояний или патологий (длительная мастурбация, хронические воспалительные процессы в простатовезикулярном комплексе). Изменения pH не имеют принципиального диагностического значения и не влияют на выбор методов лечения.

pH следует определять через стандартный для всех исследований промежуток времени –

через 1 час после эякуляции. Для определения рН спермы можно использовать индикаторную бумагу, лучше с пределами определения рН от 6 до 10 ед. Полоску индикаторной бумаги следует обмакнуть в сперму или нанести каплю исследу-

емой спермы с помощью пипетки, положить на белую непромокаемую подложку. Цвет реактивной зоны полоски быстро сравнить с эталонной шкалой. Однако более достоверный результат дает использование современных рН-метров.

Микроскопическое исследование

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

- изучение в нативном препарате подвижности сперматозоидов (кинезиограмма) и наличия агглютинации или агрегации;
 - подсчет количества сперматозоидов, лейкоцитов и клеток сперматогенеза в камере Горяева;
 - оценку жизнеспособности сперматозоидов;
 - изучение морфологии сперматозоидов, клеток сперматогенеза, лейкоцитов в окрашенных препаратах;
 - оценку в этих препаратах других клеточных элементов (макрофагов, эритроцитов, амилоидных и липоидных телец, эпителия, простейших, бактерий);
 - обнаружение в препаратах, окрашенных по Граму, грамотрицательных диплококков (Gn).
- Согласно рекомендациям ВОЗ микроскопическое исследование эякулята следует проводить

в 2 этапа. На 1-м этапе оценивается концентрация, подвижность, агрегация и агглютинация сперматозоидов, а также наличие других клеточных элементов. Исследование проводится на неокрашенных нативных мазках с использованием световой или фазово-контрастной микроскопии. На 2-м этапе проводится морфологическая классификация сперматозоидов и выявляется наличие антиспермальных антител, при необходимости оцениваются окрашенные препараты на жизнеспособность сперматозоидов. К дополнительным исследованиям сперматозоидов относят: определение тератозооспермического индекса, тест на гипоосмотическое набухание, бактериологические исследования и анализ функции придаточных половых желез. Научные разработки внедряются в диагностический процесс, в частности, за последние несколько лет разработаны методы определения свободных радикалов в эякуляте, оценки акросомальной реакции, компьютерный анализ морфологии сперматозоидов.

Метод приготовления нативного препарата

На предметное стекло, предварительно согретое до температуры хранения эякулята, полуавтоматической пипеткой с наконечником разового пользования наносится капля тщательно размешанного эякулята. Для создания тонкого слоя объем капли должен быть фиксированным и составлять 10 мкл, так же как и размер покровного стекла (22 × 22 мм).

Под тяжестью покровного стекла эякулят равномерно и однослойно распределяется по поверхности предметного стекла, обеспечивая стандартную толщину около 20 мкм и оптимальный обзор препарата. В приготовленном препарате между покровным и предметным стеклами

не должно быть пузырьков воздуха. Стабилизация препарата происходит в течение 1 мин. Не следует сильно прижимать покровное стекло, так как при толщине препарата менее 20 мкм возможны нарушения вращательных движений сперматозоидов. Исследование следует проводить при температуре не ниже 20 °С, поддерживая температуру в помещении на постоянном уровне, иначе будут искажаться результаты оценки подвижности сперматозоидов по категориям. Лучше, если микроскоп будет снабжен подогреваемым столиком, а стекла, наконечники будут храниться в нагреваемых боксах или термостате.

Предварительная оценка нативного препарата

Нативный препарат просматривается на малом увеличении с окуляром $\times 10$ или бинокляром $\times 7$ и объективами $\times 8$, $\times 10$ или $\times 20$ со спущенным конденсором или при поднятом конденсоре и закрытой диафрагме. Определяется качество приготовления нативного препарата: отсутствие пузырьков воздуха, равномерная толщина препарата. В бланке отмечается наличие агглютинации, агрегации сперматозоидов и слизи, а также присутствие эритроцитов, круглых клеток (лейкоцитов, клеток сперматогенеза, эпителия и др.) и элементов секрета простаты (кристаллов спермина, липоидных и амилоидных телец), простейших (*T. urogenitalis*).

Агглютинация

Агглютинация сперматозоидов – это склеивание подвижных сперматозоидов между собой головками, хвостами или смешанная – головок с хвостами (рис. 43). В норме у практически здоровых пациентов агглютинации сперматозоидов нет. Агглютинация позволяет предположить наличие иммунологического фактора бесплодия, однако ее нельзя считать доказательством последнего, более того, иммунологическое бесплодие возможно и в отсутствие агглютинации.

В бланке отмечается тип агглютинации (головками, хвостами или смешанный вариант) и оценивается степень агглютинации полуколичественно:

- «-» – отсутствие агглютинации;
- «+» – слабо выраженная (в нативном препарате до 10 скоплений сперматозоидов по 4–6 в каждой);
- «++» – значительная (в препарате более 20 скоплений сперматозоидов);
- «+++» – резко выраженная (в препарате более 20 скоплений, при этом в каждой более 20 сперматозоидов);

- «++++» – тяжелая степень агглютинации (рис. 44), при которой все подвижные сперматозоиды находятся в состоянии агглютинации.

Агрегация

Агрегация (псевдоагглютинация) – хаотическое скопление неподвижных сперматозоидов, нагромождение их на комочки или тяжи слизи, клеточные элементы и детрит (рис. 45). Агрегация не предполагает наличия иммунного компонента в склеивании сперматозоидов. Агрегация и агглютинация оцениваются как отдельные показатели.

Слизь

Слизь в нормальном эякуляте отсутствует. Обнаруживается слизь при воспалительном процессе уретры, бульбоуретральных желез, простаты, простатических ходов и т. д.

При определении вязкости разжиженного эякулята слизь вытягивается из общей массы спермы в виде волокон и тяжей или густой липкой массы. При нанесении капли спермы на предметное стекло может быть обнаружена слизь в виде комочков. Происхождение слизи в нативном и окрашенном азур-эозином препаратах определяется по обнаруженным и заключенным в ней эпителиальным клеткам и другим клеточным элементам. Слизь, в каком бы виде она не присутствовала в сперме, препятствует движению сперматозоидов и приводит к снижению оплодотворяющей способности спермы.

Из предстательной железы с простатическим секретом в сперму попадают липоидные и амилоидные тельца, тельца Труссо–Лалемана и кристаллизуется спермин (кристаллы Беттхера).

Липоидные тельца

Липоидные тельца – это мелкие блестящие зернышки, содержащиеся в нормальной сперме в

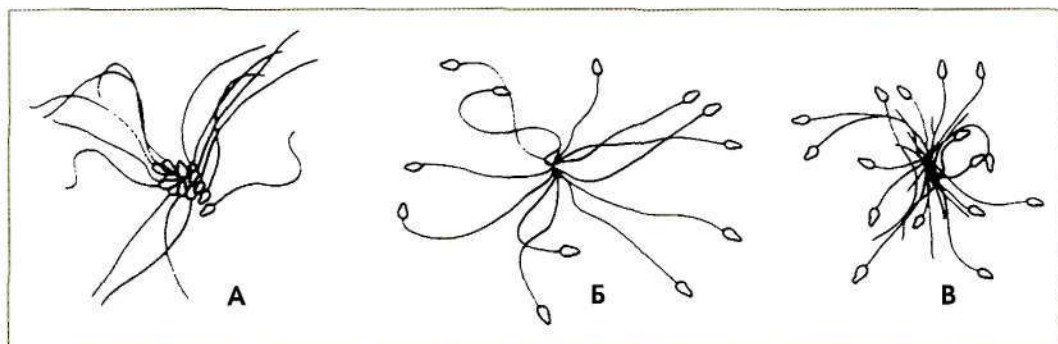


Рис. 43. Агглютинация сперматозоидов: А – головка–головка; Б – хвост–хвост; В – смешанная



Рис. 44. Выраженная агглютинация сперматозоидов. Конгломерат сперматозоидов, выраженная агглютинация хвостами. Окраска азур-эозином. $\times 1000$

большом количестве. При простатите их количество уменьшается, а при длительном воспалении липоидные тельца исчезают из спермы.

Амилоидные тельца

Амилоидные тельца (конкременты) – округлой формы образования разных размеров, серого или желтоватого цвета с характерной слоистостью, напоминающей спил дерева. Центральная часть амилоидных телец может быть мелкозернистой (рис. 46). Амилоидные тельца являются элементами застоя секрета предстательной железы, так же как и тельца Труссо–Лалемана.

Кристаллы спермина

Кристаллы спермина (Беттхера) – бесцветные, удлинённой формы с заостренными или прямоугольными концами. При этом заостренные фор-

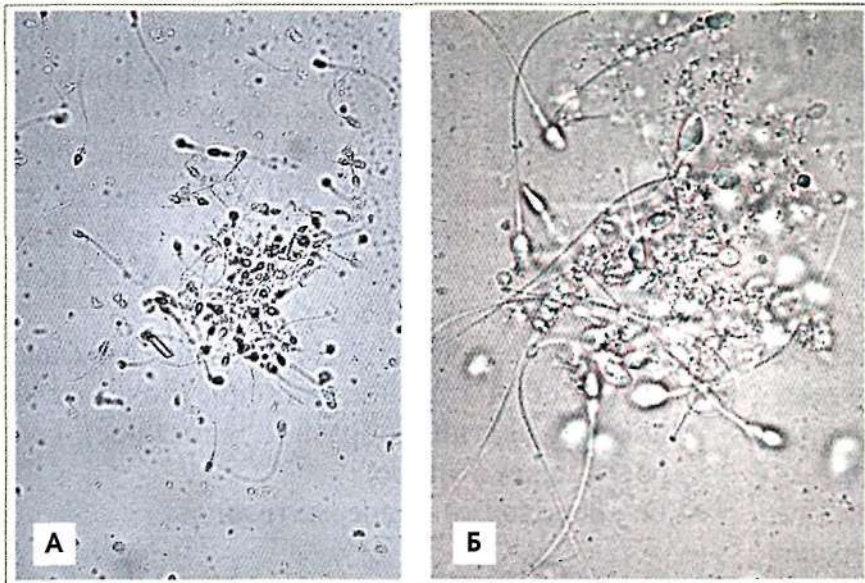


Рис. 45. Агрегация сперматозоидов. Агрегация сперматозоидов на слизи. Нативные препараты. $\times 400$ (А) и $\times 1000$ (Б)

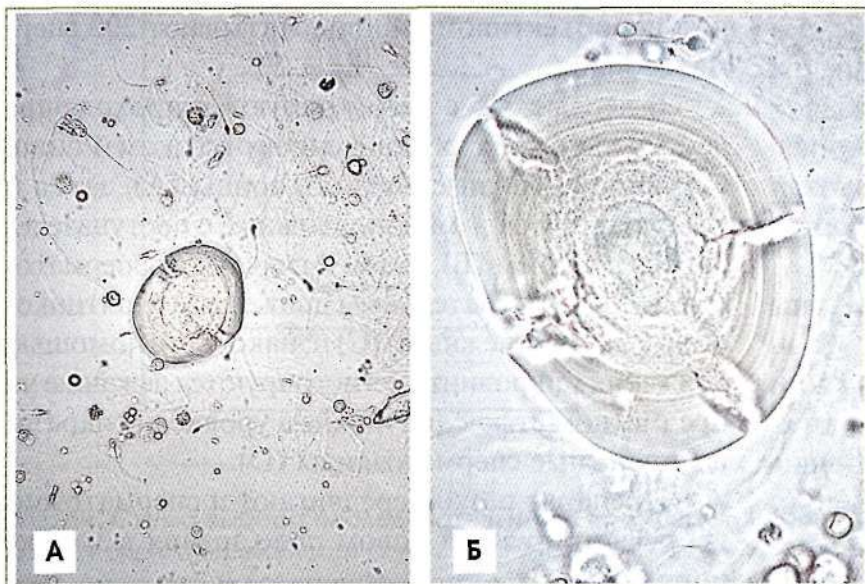
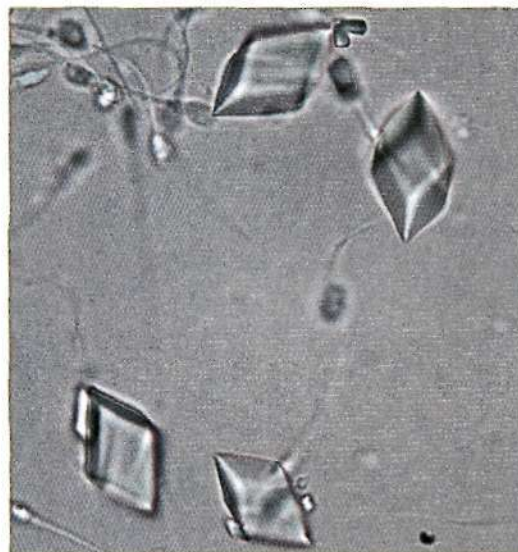


Рис. 46. Амилоидное тельце в сперме: А – амилоидное тельце слоистой структуры на фоне сперматозоидов. Нативный препарат. $\times 400$; Б – амилоидное тельце слоистой структуры, напоминающей спил дерева. Примесь застойного простатического секрета. Нативный препарат. $\times 1000$

мы напоминают кристаллы Шарко–Лейдена, прямоугольные – кристаллы трипельфосфатов, бесцветные – кристаллы мочевой кислоты. Кристаллы спермина образуются при охлаждении спермы из спермина и фосфорнокислой соли, а также при длительном стоянии спермы. При азооспермии и резко выраженной олигозооспермии кристаллы Беттхера образуются быстро и в большом количестве (рис. 47).

Рис. 47. Кристаллы спермина. Крупные кристаллы спермина, напоминающие бесцветные кристаллы мочевой кислоты. Нативный препарат спермы. $\times 400$



Метод подсчета подвижности сперматозоидов в нативном препарате (кинезиограмма)

Оценка подвижности сперматозоидов и разделение их по группам – субъективный фактор. Важна не только скорость, но и направление движения. На рис. 48 показаны 2 примера поступательного и манежного движения сперматозоида, которые рассматриваются соответственно как нормальное и патологическое.

Существует несколько рекомендаций о способах оценки подвижности. Ниже приведено разделение подвижности сперматозоидов в соответствии с рекомендациями ВОЗ.

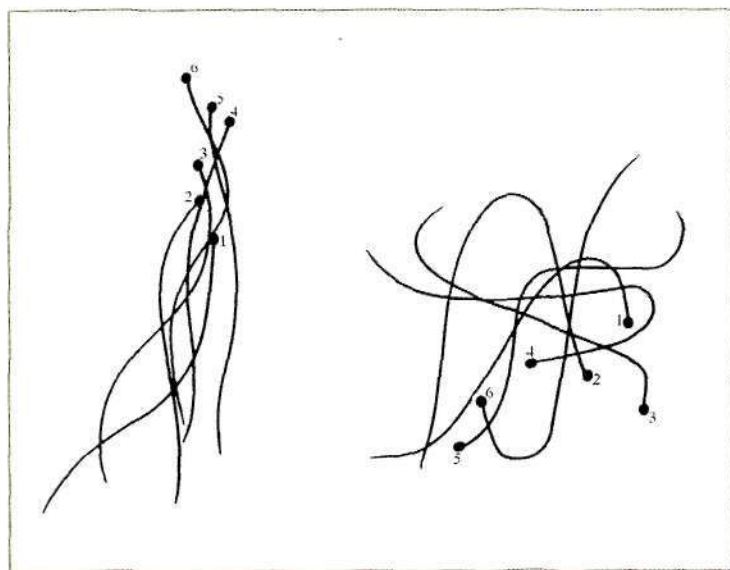


Рис. 48. Поступательное и манежное движение сперматозоидов. Цифры показывают последовательное положение сперматозоида при перемещении в препаратах

Подвижность каждого сперматозоида классифицируется по категориям А, В, С и D, при этом используются следующие критерии:

- А – быстрое поступательное движение (т. е. ≥ 25 мкм/с при 37°C и ≥ 20 мкм/с при 20°C . 25 мкм приблизительно соответствуют длине 5 головок или половине длины хвоста нормального сперматозоида);
- В – медленное, вялое поступательное движение;
- С – непоступательное движение (колебательное или маятникообразное, манежное), скорость менее 5 мкм/с;
- D – неподвижные сперматозоиды.

В окуляр $\times 10$ вкладывают ограничитель Фолио и с объективом $\times 40$ подсчитывают 200 сперматозоидов.

В первые 3–5 с регистрируются проходящие через поле зрения, ограниченное окошком Фолио, активно-подвижные сперматозоиды (А), затем в следующие 3–5 с – малоподвижные с поступательным движением (В), затем отмечаются сперматозоиды с непоступательным движением (маятникообразным и манежным) (С) и, наконец, с помощью движения микровинта регистрируются лежащие на предметном стекле (на нижнем уровне препарата) неподвижные сперматозоиды (D).

Препарат резко передвигают и сперматозоиды регистрируют в новом поле зрения в том же порядке.

Не рекомендуется изучать подвижность сперматозоидов по краю покровного стекла. Необходимо отступить от края более чем на 5 мм (рис. 49).

Если сперматозоидов мало, подсчет проводят без ограничителя Фолио.

Ответ выдается в процентах.

Нормальная подвижность сперматозоидов

Критерии ВОЗ: $\geq 25\%$ активно-подвижных сперматозоидов с поступательным движением (категория А) или $\geq 50\%$ сперматозоидов с поступательным движением – категория А + В (см. выше).

Физиологические колебания подвижности

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

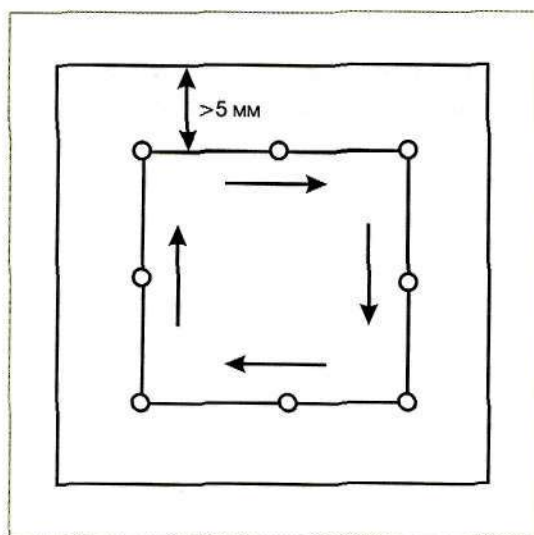


Рис. 49. Схема выбора последовательных 8 полей зрения для оценки подвижности сперматозоидов. Поля выбирают, отступив 5 мм от края покровного стекла

Астенозооспермия

Астенозооспермия – снижение подвижности сперматозоидов ниже нормы. Астенозооспермия отмечается примерно у 50% пациентов с нарушением фертильности. Заключение о *незначительной степени астенозооспермии* можно делать, если количество активно- и малоподвижных сперматозоидов с поступательным движением в сумме составляет менее 50%, но более 30%. Астенозооспермию вызывают эндогенные, генетические и экзогенные факторы, чаще всего инфекционные заболевания.

Причины астенозооспермии:

- Генетические нарушения строения жгутика.
- Энергетические нарушения, связанные с генетически обусловленными или функциональными дефектами митохондрий.
- Хронические воспалительные заболевания.
- Бактериоспермия.
- Экзогенные токсические факторы.
- Недостаток биохимических компонентов спермоплазмы (фруктоза, цинк и т. п.).
- Повышенная вязкость, слизь в эякуляте.

Хронические воспалительные заболевания.

Подвижными сперматозоиды становятся в процессе созревания в придатке яичка. Их подвижность меняется по мере продвижения вдоль эпидидимиса. Созревание сперматозоидов обусловлено андроген-зависимыми факторами, которые вырабатывает эпителий эпидидимиса.

Эпидидимиты различной этиологии вызывают снижение подвижности сперматозоидов. Астенозооспермия возникает, по-видимому, в результате нарушения секреторной функции эпителия эпидидимиса. В период между эякуляциями каудальный отдел эпидидимиса является местом хранения зрелых сперматозоидов, при его воспалении на фоне развивающейся интоксикации происходит повреждение сперматозоидов и развитие астенозооспермии и некрозооспермии.

Бактериоспермия. Возможно, некоторые микроорганизмы приводят к снижению подвижности сперматозоидов, вызывая их агглютинацию и/или адгезию. Этот процесс зависит от концентрации бактерий в сперме. Так, *in vitro* *E. coli* значительно снижает подвижность сперматозоидов в концентрации 10^4 /мл.

Экзогенные и токсические факторы. Подвижность сперматозоидов снижается при действии

электромагнитных полей, солей тяжелых металлов, свинца, наркотиков, накоплении в сперме кадмия. Экспериментально доказано, что у сперматозоидов, помещенных в магнитное поле, снижается подвижность из-за изменения формы жгутика. По-видимому, действие экзогенных факторов неспецифическое и прямо или косвенно влияет на структуру компонентов жгутиков. Так, у наркоманов были обнаружены значительные изменения микротрубочек аксонемы жгутиков, напоминающие подобные при синдроме Картагенера (сперматозоиды живые, но неподвижные).

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

Инструментальные методы исследования подвижности сперматозоидов

Погрешности и трудности при визуальном анализе сперматозоидов

Исследование спермы (спермограмма) включает определение ряда важных параметров – концентрации, подвижности, морфологии сперматозоидов, физико-химических параметров семенной плазмы. Однако наиболее важны для уточнения причин бесплодия и выбора тактики лечения концентрация сперматозоидов, их подвижность и морфология.

Важность каждого из параметров определяется объемом предполагаемой помощи. Например, если предполагается получение беременности методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), исходная концентрация сперматозоидов не имеет большого значения, так как предполагается обработка спермы с целью ее улучшения либо использование отдельных сперматозоидов (ICSI). Вместе с тем показатель подвижности имеет важное значение, так как даже при использовании технологии ICSI он свидетельствует о качестве сперматозоидов.

Многочисленные исследования показывают, что определение наиболее важных параметров (подвижность, морфология), производимое одновременно несколькими лаборантами, лабораториями либо одним лаборантом при многократном повторном анализе, имеет значительный разброс даже при использовании одного протокола и однотипного оборудования. Причем расхожде-

ния в результатах особенно велики при исследовании подвижности и морфологии сперматозоидов. Причин этому несколько. Во-первых, в протоколах нет достаточно четких критериев оценки подвижности и морфологии, а имеющиеся носят расплывчатый характер (например, термины «быстрое», «медленное движение» применительно к подвижности либо «овальная», «большая» – в описании морфологии головки сперматозоида и т. п.), что разрешает различную трактовку и субъективизм в оценках. Это связано со сложностью введения объективных критериев метрологической оценки из-за особенностей человеческого восприятия. Во-вторых, несмотря на существование единого протокола и периодически проводимые семинары, конференции, сложно стандартизовать такую процедуру, как, например, подсчет подвижности, когда в одном поле зрения находится большое количество объектов. В этом случае в зависимости от концентрации внимания лаборанта на одной из категорий сперматозоидов возможно завышение этой категории (погрешность возрастает при повышении концентрации или подвижности). В-третьих, сами протоколы допускают различные варианты использования лабораторной техники (например, в протоколе ВОЗ предлагается использовать на выбор несколько типов счетных камер, несколько вариантов способов окраски сперматозоидов), что, несмотря на примерную однотипность, вносит дополнительные погрешности.

Исследование подвижности является одним из важных показателей фертильных качеств сперматозоида, поскольку часто оно напрямую зависит от морфологической зрелости, функциональных резервов, отсутствия влияния аутоантител, инфекционных агентов. Применение терапевтических процедур в первую очередь сказывается на показателях подвижности. Кроме того, существует ряд исследований, показывающих достоверное увеличение фертильности сперматозоидов, имеющих скорость прогрессивного движения более 25 мкм/с. Существует взаимосвязь между характером подвижности (прямолинейностью) и морфологией шейки и хвоста сперматозоида, так как при патологии хвоста и особенно шейки наблюдается менее прямолинейное, более хаотичное движение.

В целом, имея значения показателей концентрации высокоподвижных сперматозоидов и про-

цент клеток с нормальной морфологией, можно составить представление о перспективах фертильности пациента и выбрать одну из методик ВРТ.

Из-за субъективного характера критериев, рекомендуемых протоколом исследования эякулята ВОЗ, можно условно разделить все сперматозоиды на четыре категории по трем параметрам – скорость, прямолинейность и прогрессивный характер движения. Исходя из субъективного наблюдения за множеством движущихся в поле зрения сперматозоидов, рассчитывать на достаточно объективное исследование сложно, так как при подсчете подвижности под микроскопом при увеличении $\times 400$ в поле зрения находится в среднем 160–180 сперматозоидов (1 большой квадрат камеры Горяева). Использование особых приемов (ограничитель поля зрения, подсчет по секторам и др.) не решает проблемы, так как приходится анализировать порядка 30–40 движущихся объектов одновременно.

Метод фотомонтажа

В конце 70-х годов прошлого века А. Makler предложил использовать метод фотографирования движущихся сперматозоидов и их треков. На сделанных через определенные интервалы времени фотографиях можно было измерить протяженность трека, вычислить линейную скорость сперматозоида и, таким образом, получить количественное представление о его подвижности. Из величины треков в единицу времени вычислялся процент сперматозоидов с разной подвижностью. Этот метод, равно как и все другие методы, использующие фоторегистрацию, не получил распространения в клиничко-диагностических лабораториях из-за трудоемкости и необходимости создания еще и фотолаборатории.

Методы лазерного зонда

Группа методов лазерного зонда и лазерного доплера основывается на регистрации движущихся объектов (сперматозоидов) лучом лазера через определенные промежутки времени в течение длительного периода с использованием доплер-эффекта. Это позволяет косвенным образом выявлять так называемую «скрытую» гипокинезию сперматозоидов: определять время, в течение которого они сохраняют хорошую подвижность, и ориентироваться в оптимальных сроках выполнения инсеминации, ЭКО и т. д. Наряду с очевид-

ными достоинствами этого метода существуют и определенные недостатки: сложность, невозможность визуального контроля за проведением анализа и самый главный недостаток – отсутствие разграничения всей популяции сперматозоидов на группы по степени подвижности.

Фотометрия в капилляре

В настоящее время создана группа анализаторов, которая использует метод фотометрии эякулята в тонком капилляре в проходящем свете с использованием обычных источников света или лазера («Биола», Россия; SQA-V, Израиль, рис. 50). Через пучок света может пройти только один сперматозоид, по изменению импульсов света в тонком капилляре анализатор оценивает концентрацию, подвижность, оптическую плотность головки.

Анализ качества спермы с применением автоматических анализаторов качества спермы SQA-V

Автоматические анализаторы качества спермы SQA-V практически полностью заменили мануальные методы анализа в большинстве западных лабораторий и в последнее время все более широко внедряются в практику российских КДЛ. Анализаторы SQA-V позволяют достаточно быстро (в течение 75 секунд с учетом распечатки и архивирования результатов) и с высокой точностью (поскольку при определении показателей анализа измерениям подвергаются десятки тысяч клеток) определить 15 показателей качества образца спермы. Важным отличием автоматических анализаторов качества спермы серии SQA-V является их простота в эксплуатации. Поскольку все процедуры измерения прибор выполняет автоматически, то при работе на нем специальная подготовка персонала не требуется.

Автоматические анализаторы качества спермы SQA-V определяют следующие параметры:

- Общая концентрация сперматозоидов (TSC).
- Подвижность (a + b + c).
- Поступательная подвижность (a + b).
- Непоступательная подвижность (c).
- Неподвижность (d).
- Процент сперматозоидов с нормальной морфологией.
- Концентрация подвижных сперматозоидов (MSC).



Рис. 50. Автоматический анализатор качества спермы SQA-V

- Концентрация сперматозоидов с поступательной подвижностью (PMSC).
- Концентрация функциональных сперматозоидов (FSC).
- Индекс подвижности спермы (SMI).
- Средняя скорость сперматозоидов с поступательной подвижностью.
- Общее количество сперматозоидов.
- Общее количество подвижных сперматозоидов.
- Общее количество сперматозоидов с поступательной подвижностью.
- Общее количество функциональных сперматозоидов.

Алгоритм проведения анализа и основные принципы работы анализатора SQA-V

В анализаторе качества спермы SQA-V исследуется свежая, замороженная сперма, специально обработанная (отмытая, обогащенная) или сперма после вазэктомии.

Исследование концентрации и подвижности сперматозоидов проводится в специальном капилляре (рис. 51).

Оператор вставляет капилляр в отсек измерительного капиллярного блока анализатора SQA-V и нажимает кнопку начала измерения.

После этого запускается процесс анализа: источник света в оптическом устройстве активиру-

ется и свет проходит через заранее определенный участок капиллярной трубки. Оптический сенсор, расположенный на обратной стороне капиллярной трубки, определяет вариации света, вызванные движением сперматозоидов. Электрический сигнал, производимый оптическим сенсором, имеет волнообразную форму, соответствующую подвижности сперматозоидов и их качественным характеристикам. Измерения повторяются через каждые 10 секунд в течение 40 секунд, после чего результаты высвечиваются на дисплее прибора.

Основные показатели эякулята, измеряемые на анализаторе SQA-V

Концентрация сперматозоидов определяется в кюветной секции капилляра. Метод измерения – фотометрия. Определяется количество поглощенного/отраженного инфракрасного света, проходящего через семенную жидкость. Анализируются миллионы клеток спермы. Количество света, поглощенного сперматозоидами, измеряется детектором оптической плотности. Общая абсорбция света переводится в общую концентрацию сперматозоидов микропроцессором с помощью соответствующего алгоритма.

Подвижность определяется в капиллярной секции капилляра методом анализа модуляций света, вызванных движением сперматозоидов. При этом анализируются траектории движения

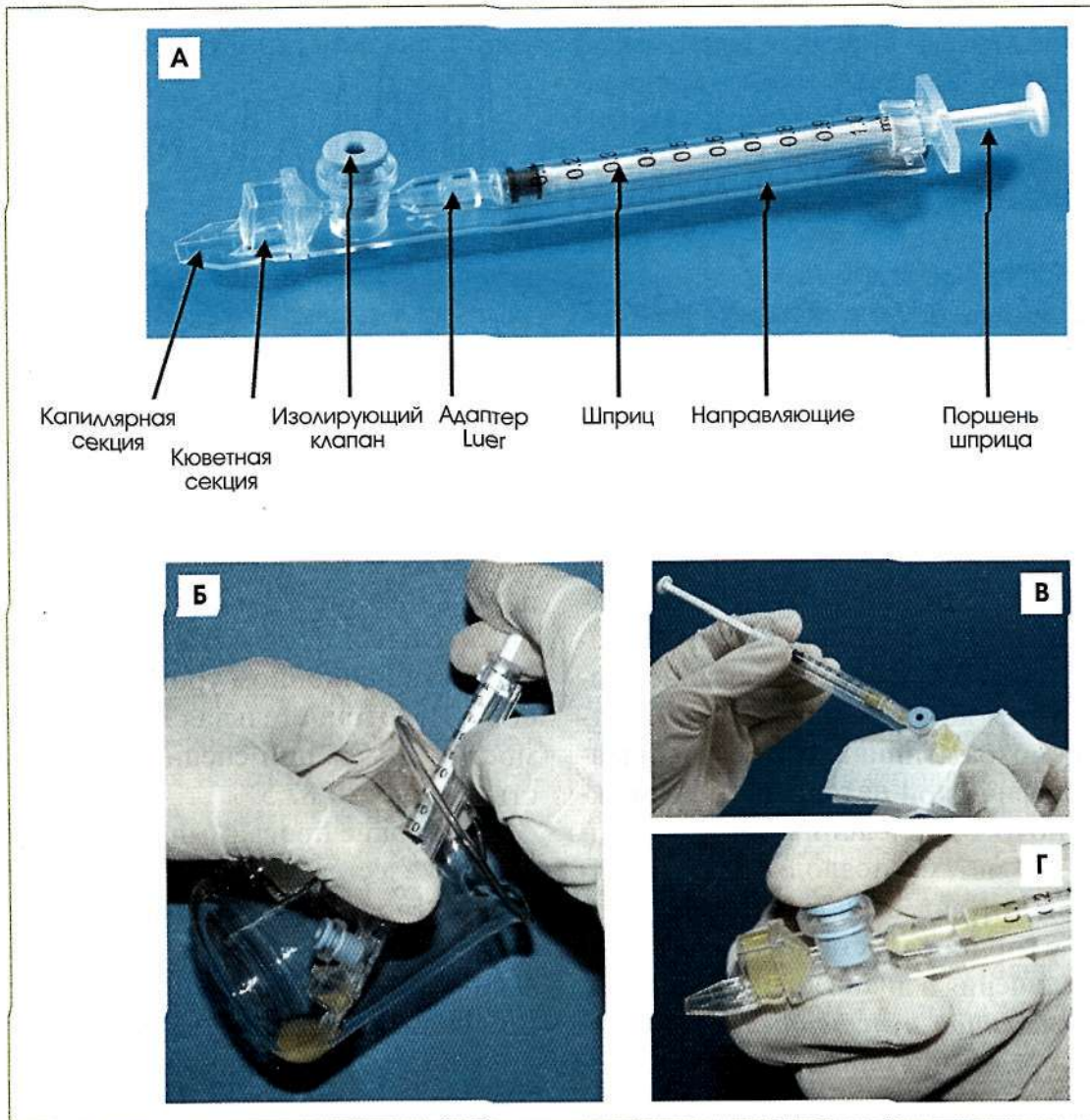


Рис. 51. Капилляр для анализа качества спермы. В капилляр (А) методом аспирации забирается 1 мл спермы (Б). Для этого кончик капилляра полностью погружается в образец спермы. Далее с помощью поршня образец медленно засасывается до тех пор, пока капиллярная и кюветная части не заполнятся – жидкость должна появиться в адаптере Luer. После заполнения капилляра оператор протирает его наружную поверхность мягкой тканью (В) и закрывает изолирующий клапан. В таком виде капилляр полностью готов к проведению анализа (Г)

десятков тысяч клеток, что обеспечивает высокую точность анализа. Модуляции света преобразуются в электронные сигналы, создаваемые каждым сперматозоидом, и выдаются как «пики и плато» (рис. 52). Электронные сигналы пиков усредняются, и среднее значение пиков переводится в среднюю скорость, или подвижность. Так как траектории движения различных категорий сперматозоидов (а, b, с и d) существенно различаются, то модуляции света (и соответственно, электронные сигналы), вызываемые сперматозоидами с быстрым прогрессивным движением, отличаются от сигналов, вызываемых сперматозоидами с

медленным прогрессивным движением. Неподвижные сперматозоиды совсем не создают каких-либо колебаний света.

Морфология сперматозоидов на анализаторе SQA-V – расчетный параметр. Принцип расчета основан на корреляции между подвижностью сперматозоидов и их морфологией. В анализаторе SQA-V реализован специальный алгоритм, который рассчитывает процент сперматозоидов с нормальной морфологией по отношению к подвижности, прогрессивной подвижности и скорости. Компьютер выдает отчеты по результатам в стандартизированной форме по требованиям ВОЗ.

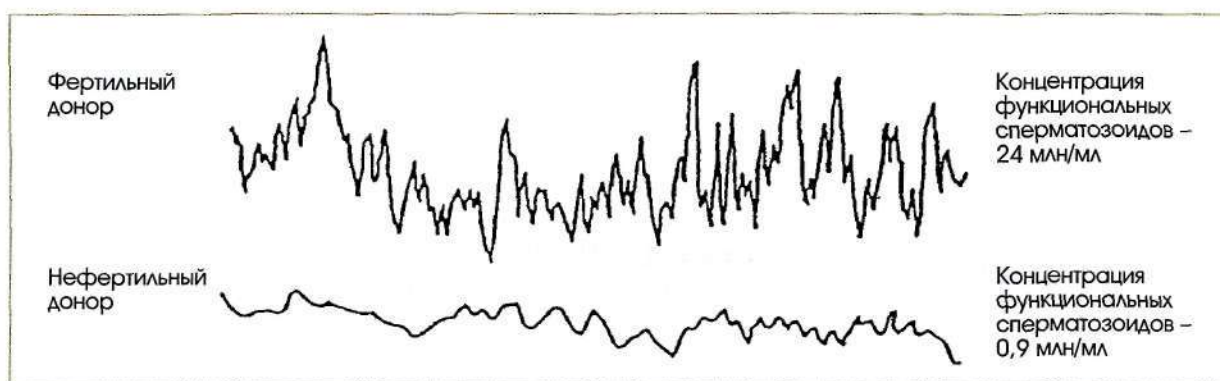


Рис. 52. Электронные сигналы движущихся сперматозоидов доноров с различной фертильностью на анализаторе качества спермы SQA-V

Система визуализации является автономной и работает независимо от остальных блоков анализатора. Рациональная комбинация визуализации с автоматической компьютеризированной системой используется как дополнительный инструмент для просмотра атипичных случаев, идентификации специфической патологии и возможности визуального определения морфологии сперматозоидов. Система позволяет осуществлять прямой просмотр видеоизображения на цветном видеодисплее прибора, остановку изображения и выбор увеличения в диапазоне 300–500 раз.

Режим повышенной чувствительности используется для определения олиго-, астено- и азооспермии, а также для анализа образцов после вазэктомии.

Контроль качества работы анализатора обеспечивается использованием контрольных материалов «QwikCheck-Beads™», представляющих собой набор, содержащий флаконы с известными концентрациями 4-микронных латексных частиц, взвешенных в жидком разбавителе. Контрольные образцы измеряются таким же образом, как и определение сперматозоидов под микроскопом и в системе визуализации SQA-V.

Точностные характеристики анализаторов SQA-V достаточно высоки. Коэффициент корреляции результатов, полученных на анализаторе SQA-V и «ручным» методом, для концентрации сперматозоидов составил 0,90, для оценки подвижности – 0,85.

В отделении акушерства и гинекологии центрального госпиталя г. Афула (Израиль) изучали прогностическую значимость индекса подвижности спермы (SMI), определенного на анализа-

торе SQA-V, в отношении вероятности интракорпорального оплодотворения. Показано, что положительная прогностическая значимость (при дискриминационном уровне SMI = 50) составляет 97,4%, отрицательная прогностическая значимость – 10,7% при специфичности 39,4% и чувствительности 87,5%.

Широкие программные возможности анализатора качества спермы SQA-V позволяют эффективно использовать этот прибор как для диагностики фертильности, так и для мониторинга лечения пациентов. Более подробную информацию по анализатору качества спермы SQA-V можно получить в АО «Юнимед» (www.unimedao.ru).

Компьютерный анализ подвижности сперматозоидов

С развитием высокоскоростной съемки и компьютерных технологий стали возможны исследования движения одновременно нескольких клеток с определением траектории их перемещения и скорости. Использование аппаратно-программных комплексов для определения концентрации, характеристики движения сперматозоидов, а также морфологических критериев клеток легло в основу новой технологии в лабораторной медицине – CASA (computer-assisted semen analysis) – компьютерного анализа подвижности сперматозоидов. CASA позволяет проводить оценку таких показателей подвижности, как криволинейная скорость, прямолинейная скорость, линейность. Совокупное использование полученных данных позволяет объективизировать оценку качества спермы и преодолеть

субъективность интерпретации, присущей стандартной спермограмме.

Устройство и принцип работы анализатора CASA

Макет и получаемое изображение траекторий сперматозоидов представлены на рис. 53. В состав аппаратно-программного комплекса входят микроскоп, система ввода изображения, компьютер и специализированное программное обеспечение.

В системе используется световой или фазово-контрастный микроскоп ($\times 400$). Применение фазово-контрастной оптики предпочтительнее, так как большинство видеомикроскопических систем не смогут обеспечить достаточную глубину резкости, чтобы захватить сперматозоид в поле наблюдения в обычном световом микроскопе.

Основой компьютерных спермоанализаторов являются технологии цифровой обработки видеозображения. Несмотря на то что в основе действия всех систем CASA лежат схожие основные принципы, существуют значительные различия в используемых оптических системах, в технологии захвата изображения, в методах распознавания сперматозоидов, восстановлении трека, алгоритмах столкновения и анализа движения, а также в анализе данных.

Компьютер с видеокартой, преобразующей видеосигнал в цифровой код, должен успевать обрабатывать сигналы от видеокамеры. Один из

важных показателей – частота обновления поступающей информации или, проще говоря, частота кадров. Минимально – 25 кадров в секунду, оптимально – 50, иначе высокоподвижные сперматозоиды будут теряться и компьютерная система не сможет идентифицировать траекторию сперматозоидов. Видеокарта должна обеспечивать не меньшее разрешение, чем видеокамера. Для быстрой работы такой системы необходим высокопроизводительный компьютер. Программное обеспечение, выполняющее распознавание и подсчет сперматозоидов, составляет основную часть анализатора и, в конечном счете, определяет характеристики анализатора.

Для съемки движения сперматозоидов нужна видеокамера с высокой разрешающей способностью, чаще черно-белого изображения. От величины разрешения напрямую зависит качество определения сперматозоида и измерения его подвижности. При работе с подвижными объектами используются аналоговые и цифровые видеокамеры (рис. 54). Микрофильм может быть получен непосредственно во время обработки пробы или сохранен на носителе в виде файла, а затем загружен и использован в работе. В настоящее время наиболее часто используется система ввода, состоящая из аналоговой камеры и платы ввода изображения *фрэймгребера* (от английского *frame* – кадр, *grabber* – захват). Функциональное назначение фрэймгребера – преобразование аналогового сигнала с ка-

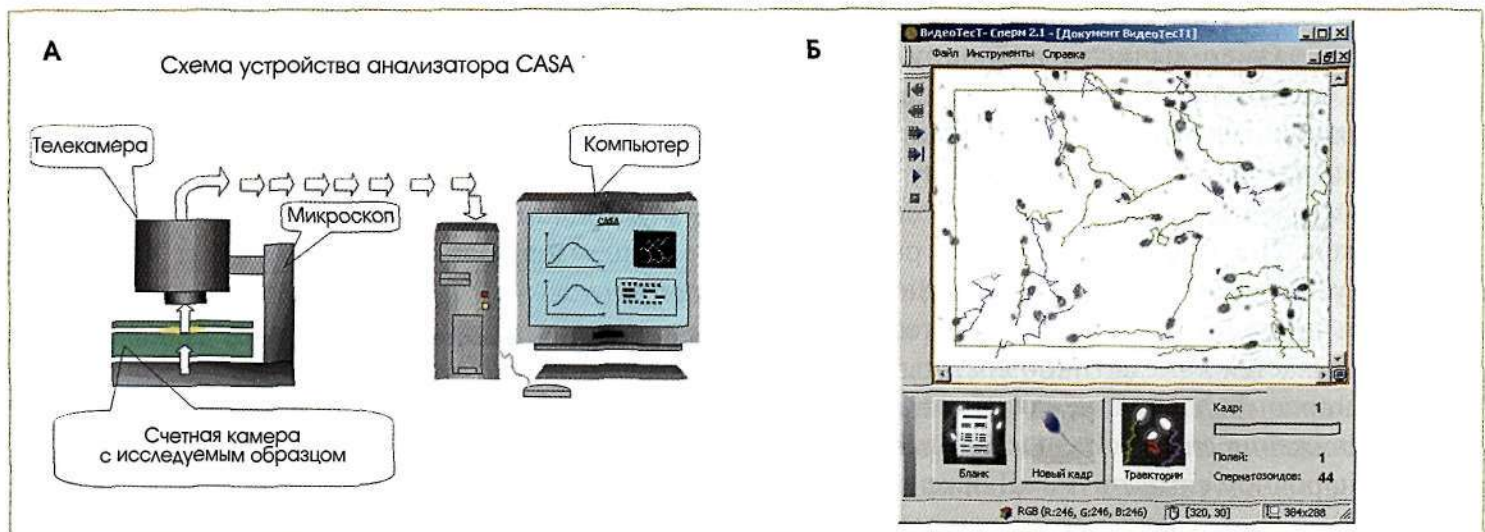


Рис. 53. Телевизионно-микроскопическая система анализатора CASA: А – анализатор подвижности сперматозоидов проводится под микроскопом с помощью аналоговой или высокоскоростной цифровой камеры; Б – обработанный видеоролик с траекториями движения сперматозоидов. Каждый сперматозоид фиксируется камерой, на экране определяются траектории движения всех сперматозоидов за период регистрации

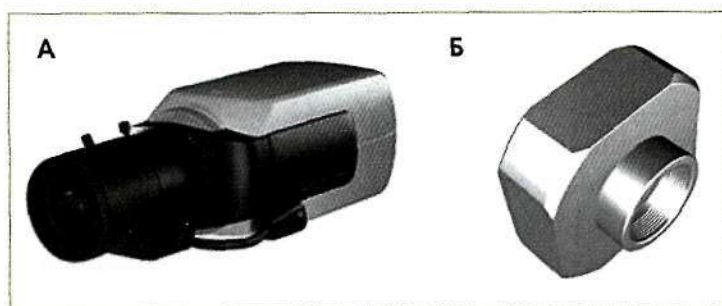


Рис. 54. Видеокamеры для анализатора CASA: А – аналоговая камера; Б – цифровая камера

меры в цифровой, который «понимает» компьютер. В продаже появились также цифровые камеры с интерфейсом USB 2.0, которые позволяют снимать видеоролики с не меньшим, а иногда и более высоким количеством кадров в секунду, чем аналоговые камеры, при требуемом разрешении.

При анализе оцифрованных изображений сперматозоидов программа CASA должна проследить движение каждого из них от одного кадра к следующему (рис. 55). Создание траектории движения достигается путем определения максимального расстояния, которое может преодолеть объект между двумя кадрами. Это пространственное перемещение представляет собой радиус окружности максимальной вероятности и рассчитывается с учетом скорости движения и скорости кадра. Если в окружности находится более одного объекта, траекторию создают для центроида, находящегося ближе всего к центру окружности. В случае если внутри окружности нет клетки, увеличивается размер вычисляемой окружности и поиск продолжается. Такой подход называется интерполяцией прерванной траектории.

Если центроид не двигается между последовательными 3–4 кадрами, то считается, что он неподвижен. После восстановления траекторий анализируется их форма, устанавливаются характеристики движения каждой клетки. Этот процесс CASA называется кинематикой спермы.

Терминология, используемая для описания характера движения сперматозоидов, была принята на международном симпозиуме «Движение человеческой спермы и ее анализ», прошедшем в 1988 г. в городе Монпелье во Франции. Характеристики движения, изложенные в итоговом соглашении, были взяты из анализа центроида головки и представлены всеми современными системами CASA.

Показатели, регистрируемые анализатором CASA

В зависимости от анализатора возможно вычисление нескольких параметров: концентрации сперматозоидов, показателей подвижности, морфологии сперматозоидов. Основным вычисляемым параметром – скорости движения сперматозоидов.

Основные два показателя подвижности сперматозоида (рис. 56):

- VCL (curvilinear velocity, мкм/с) – фактическая скорость перемещения сперматозоида по траектории.
- VSL (straight-line velocity, мкм/с) – скорость перемещения сперматозоида из точки обнаружения до точки нахождения его в момент окончания анализа (скорость прямолинейного продвижения).

Эти два параметра должны определяться обязательно и однотипно, вне зависимости от применяемого оборудования. По ним производится калибровка и контроль качества измерений анализаторов CASA при помощи видеозаписей.

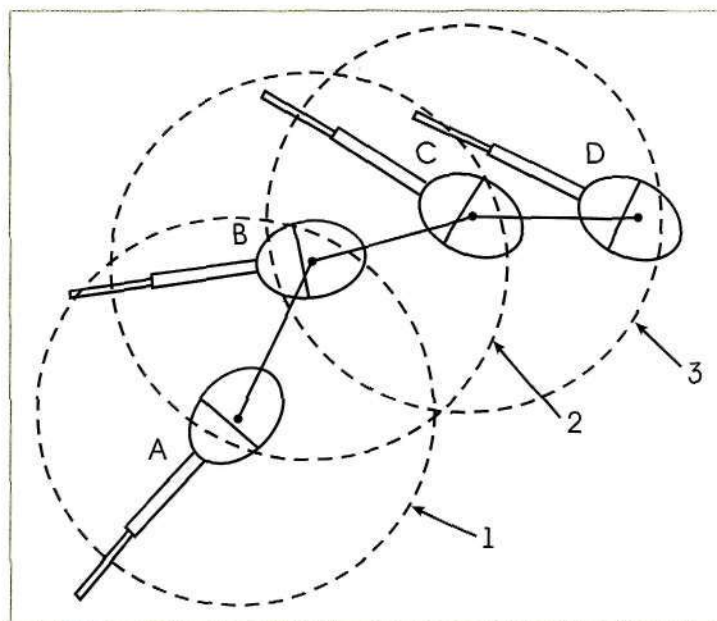


Рис. 55. CASA. Восстановление трека движения сперматозоида с помощью ряда снятых последовательно изображений головок центроидов. Создание траектории движения достигается определением максимального расстояния, которое может преодолеть объект между двумя кадрами. Это пространственное перемещение представляет собой радиус окружности максимальной вероятности и рассчитывается с учетом скорости движения сперматозоида и скорости кадра. Чем выше частота кадров, тем меньший строится радиус и уменьшается вероятность, что в окружность попадет другой сперматозоид и произойдет «потеря» объекта

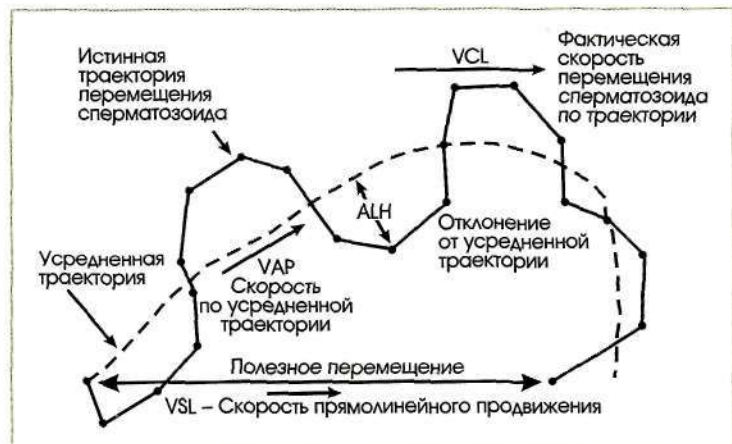


Рис. 56. Параметры движения сперматозоида, регистрируемые анализатором CASA

Дополнительные параметры – их характеристики зависят от способа математического анализа трека сперматозоида (сглаживание траектории).

ALH (amplitude of lateral head displacement, мкм) – амплитуда латерального смещения головки сперматозоида от своей средней траектории движения.

VAP (average path velocity, мм/с) – средняя скорость головки сперматозоида по усредненной траектории движения сперматозоида.

Вычисляемые параметры получают путем математической обработки измеряемых параметров. Эти показатели могут быть включены не все, некоторые показатели вводятся производителями анализаторов.

LIN (linearity VSL/VCL, %) – линейность траектории – величина колебания истинной траектории движения по отношению к средней траектории.

WOB (wobble VAP/VCL) – степень отклонения фактической траектории относительно усредненной.

STR (straightness VSL/VAP) – линейность усредненной траектории (полезное перемещение).

BCF (beat-cross frequency, Гц) – частота пересечений сперматозоидом его средней траектории за единицу времени (частота «биения» головки).

MAD (mean angular displacement) – скорость изменения фактической траектории движения.

Счетные камеры

Большое значение имеет устройство счетной камеры, в которую помещается образец эякулята. Предлагается множество типов камер. Основной критерий отбора камеры – глубина. Реко-

мендуется глубина в 20 микрон, так как подобная глубина позволяет сперматозоидам свободно перемещаться и вместе с тем сперматозоиды находятся все время в фокусе оптики микроскопа. В случае азооспермии рекомендуется использовать камеры глубиной 100 мкм. Существуют различные мнения по поводу необходимости и целесообразности предварительного разведения образца спермы перед анализом. Опытным путем был найден интервал концентраций сперматозоидов, в котором анализатор CASA может обеспечить достаточную точность подсчета, он отличается в зависимости от применяемого оборудования, но в целом находится в пределах 20–60 млн сперматозоидов в мл. При значительном превышении этого предела целесообразно разведение спермы. Помимо прочего, разведение приводит к гомогенизации взвеси сперматозоидов и исключению факторов семенной плазмы, могущих повлиять на подвижность. Это преимущество является, скорее, спорным, так как, хотя оно и дает возможность определить истинные кинетические характеристики сперматозоидов, но может исказить истинные фертильные способности спермы. Такую процедуру необходимо производить при обследовании сперматозоидов пациентов, к которым будут применены технологии ВРТ. Однако у таких пациентов часто отмечается олигозооспермия, поэтому применение CASA, особенно после разведения, затруднительно. Для разведения обычно используется один из буферов, применяемых в лаборатории ЭКО, либо донорская серонегативная семенная плазма.

Для автоматизированного подсчета получили распространение счетные камеры, заполнение которых не требует предварительного разведения, – LEJA (рис. 57), Маклера (рис. 58) и др.

Подогреваемый столик

Подогревание спермы и сохранение в процессе анализа температуры, близкой к температуре тела, – важный вопрос стандартизации исследования. Протоколы допускают проведение анализа при «комнатной» температуре, но в этом случае критерии должны быть скорректированы с помощью референтных видеозаписей. Следует признать, что применение подогреваемых столиков и средств поддержания температуры позволяет стандартизировать исследование, прибли-

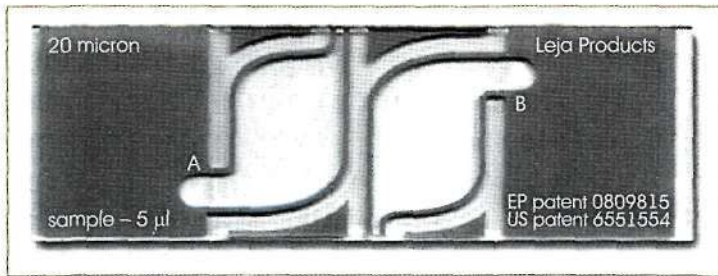


Рис. 57. Счетная камера LEJA представляет собой цельную, неразборную конструкцию глубиной 12, 20 и 100 мкм. На двух- (четырёх-) камерное предметное стекло нанесено покровное стекло и специальная насечка для заполнения исследуемого материала. Такое устройство обеспечивает равные условия для всех анализируемых образцов и предотвращает попадание пузырьков воздуха. Предназначена камера для одноразового использования

зить условия исследования к реальным, исключает «холодовой шок» сперматозоидов.

Анализ результатов технологии CASA на примере аппаратно-программного комплекса «Видеотест-СПЕРМ» компании «Видео-Тест»

Анализ производится в следующей последовательности: образец эякулята помещается в счетную камеру, которая устанавливается на предметный столик микроскопа, и снимается короткий видеоролик.

Регистрация подвижности сперматозоидов

По проведенным измерениям все сперматозоиды делятся на классы активности в соответ-

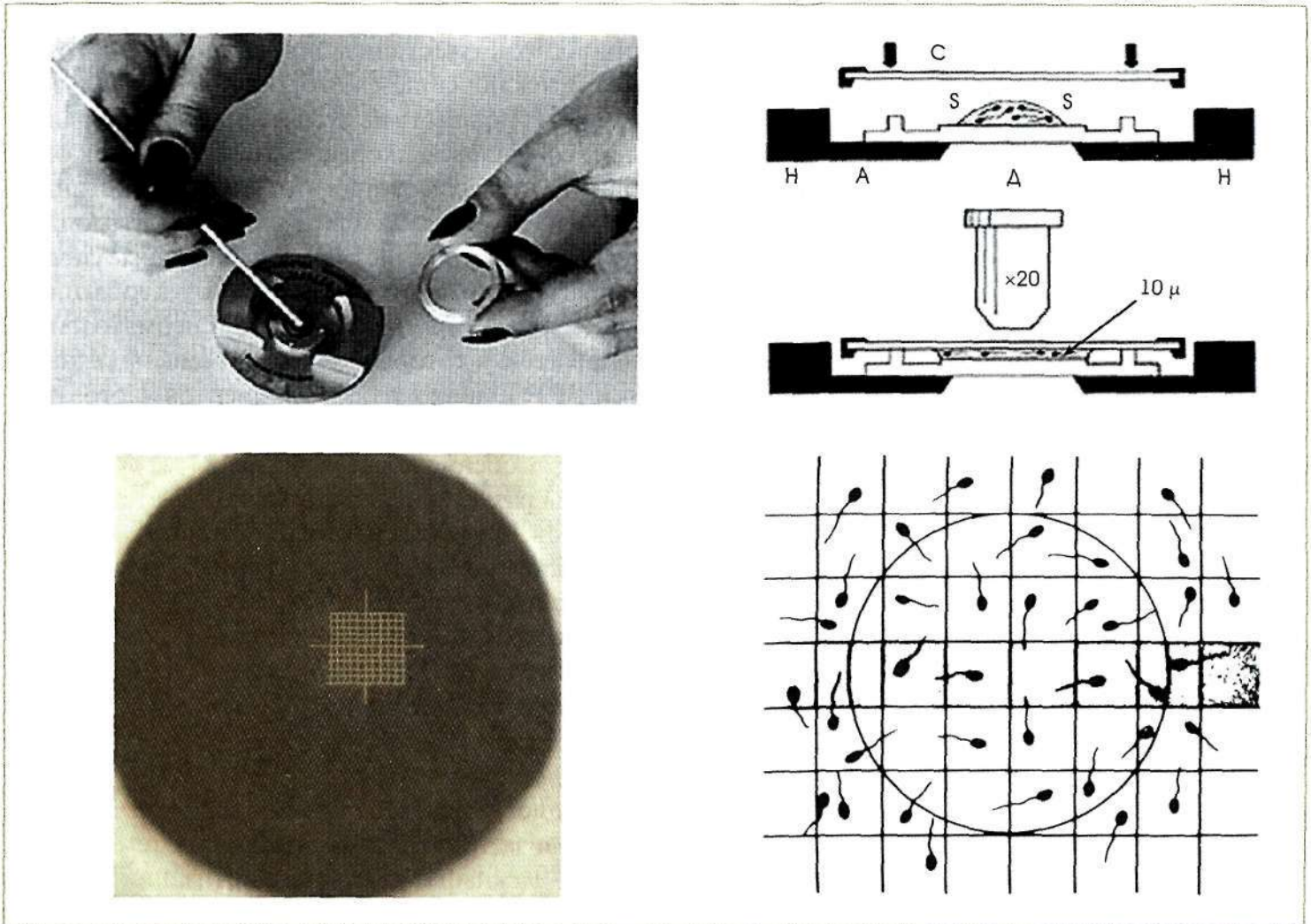


Рис. 58. Камера Маклера (отечественный аналог – камера Осипова) для подсчета концентрации сперматозоидов без разведения в нативном препарате. В камере Маклера нижняя, основная часть имеет металлическую основу (А) и две ручки (Н). В центре основания находится плоский диск (Д), на который помещается исследуемый материал (S). По бокам диска – четыре покрытых кварцем возвышения, выступающие на 10 микрон над поверхностью центральной части, на которые помещается покровное стекло (С). В камере Маклера все сперматозоиды находятся в одной оптической плоскости

ствии с требованиями, выдвинутыми в «Руководстве ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью», сперматозоиды по подвижности делятся на 4 класса: А, В, С, D (рис. 59).

Класс А – прогрессивно-подвижные сперматозоиды, т. е. сперматозоиды с высокой скоростью прямолинейного движения (VSL) и траекторией движения, близкой к прямолинейной (высоким значением LIN).

Класс В – сперматозоиды с:

- прямолинейной траекторией и средней скоростью прямолинейного движения (тип В1);
- траекторией движения, имеющей существенные отклонения от прямолинейной, со средней и высокой скоростью прямолинейного движения (тип В).

Класс С – сперматозоиды с непрямолинейной траекторией движения и со средней или высокой скоростью прямолинейного движения.

Класс D – неподвижные или очень малоподвижные сперматозоиды.

Дополнительно в методике выделяются и подсчитываются круглые клетки (лейкоциты, эритроциты, эпителиальные клетки, клетки сперматогенеза). Круглые клетки отличаются от сперматозоидов по размерам и форме.

Информация о процентном содержании сперматозоидов каждого класса подвижности, концентрации сперматозоидов (в млн на мл) и содержании круглых клеток (в млн на мл) автоматически передается в карточку базы данных (рис. 60). В соответствующие поля карточки также поступает информация о средних значениях параметров подвижности для каждого класса (рис. 61).

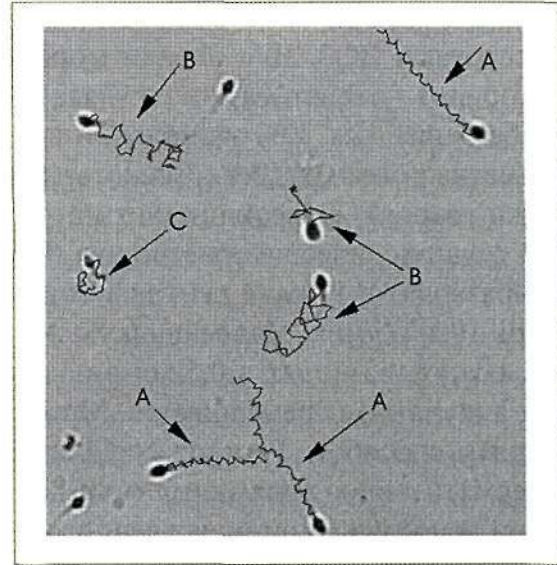


Рис. 59. Виды траекторий сперматозоидов классов А, В и С. Класс А – прогрессивно-подвижные сперматозоиды; класс В – сперматозоиды со средней скоростью прямолинейного движения; класс С – сперматозоиды с непрямолинейной траекторией движения

Пользователь системы имеет возможность просмотреть обработанный видеоролик (по кадрам или целиком). На видеоролике отображаются траектории движения сперматозоидов, цвет которых соответствует цвету класса подвижности. После обработки первого видеоролика пользователь системы может обработать следующие. Результаты анализа накапливаются в карточке базы данных.

Регистрация морфологии сперматозоидов

Компьютерный анализ позволяет произвести точные измерения морфологических параметров. При анализе морфологии сперматозоидов программа «Видеотест-СПЕРМ» настроена на препараты,

Подвижность

Класс А, %	24,8	Поиск	4
Класс В, %	47,8	К-во:	113
Класс С, %	7,1		
Класс D, %	20,4		
Концентрация, млн/мл:	62		
Круглые клетки, млн/мл:	4		

Подвижность

Класс	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
А	39,9	38,1	57,6	0,9	8,9	95,3	68,9
В	19,8	16,6	46,4	1	7,6	85,7	44,9
С	30,4	18,3	106,8	2,6	7	63,4	17,2
Неподвижные	2,6	1,3	16,2	0,3	8,4	55	16,7

Рис. 60. Фрагмент карточки базы данных «Видеотест-СПЕРМ» с информацией по концентрации и подвижности сперматозоидов

Рис. 61. Фрагмент карточки базы данных с информацией о средних значениях параметров подвижности сперматозоидов технологии CASA на примере аппаратно-программного комплекса «Видеотест-СПЕРМ» компании «Видео-Тест»

окрашенные по методу «Diff-Quik», рекомендованному экспертами ВОЗ. Для оценки морфологии сперматозоидов готовят мазки эякулята на тщательно обезжиренных 70% этанолом и высушенных предметных стеклах. Для компьютерного анализа мазки готовят из фракции сперматозоидов, отмытой физиологическим раствором (0,5–1 мл эякулята разводят в 10 раз), центрифугируют 10–15 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок разводят в 0,5 мл р-ра хлорида натрия и аккуратно перемешивают. Мазок готовят обычным способом. Раствор NaCl для отмывания сперматозоидов должен иметь температуру 37 °С. При использовании охлажденного раствора сперматозоиды могут деформироваться. Мазки высушивают на воздухе и фиксируют (рис. 62).

Окрашенный мазок спермы помещается на столик микроскопа. Изображение мазка захватывается с помощью установленной на микроскоп системы ввода. На полученном в окне программы изображении сперматозоиды выделяются автоматически (рис. 63).

При анализе морфологии обрабатывается достаточное число полей зрения препарата для набора 100–200 клеток. После завершения их обработки все проанализированные сперматозоиды могут быть просмотрены в виде галереи, в которой представлены нормальные и патологические формы (рис. 64).

Результаты анализа подвижности и концентрации в нативных препаратах и морфологии спер-

мы в окрашенных мазках автоматически передаются и сохраняются во встроенной базе данных.

База данных позволяет хранить и быстро находить нужную информацию.

Преимущества и недостатки видеокomпьютерного анализа

Основное преимущество – это достоверность определения. В зависимости от количества одновременно находящихся в поле наблюдения сперматозоидов компьютер рассчитывает параметры движения либо всех, либо большей их части, что невозможно при ручном производстве спермограммы.

Другое важное преимущество – воспроизводимость, т. е. результат исследования не зависит от лаборанта, производящего исследование, от уровня его подготовки, степени концентрации внимания или усталости. Можно быть уверенным, что проведенный одному пациенту анализ подвижности в разное время будет правильно отражать изменения показателей, исключая погрешности преаналитической стадии.

Следующее преимущество – объективность: анализатор измеряет истинные скорости движения сперматозоидов, позволяя объективно судить о фертильности спермы.

Совершенствование компьютерной морфологической диагностики позволяет получить принципиально новую количественную информацию, недоступную врачу при обычном визуальном анализе изображений под микроскопом.

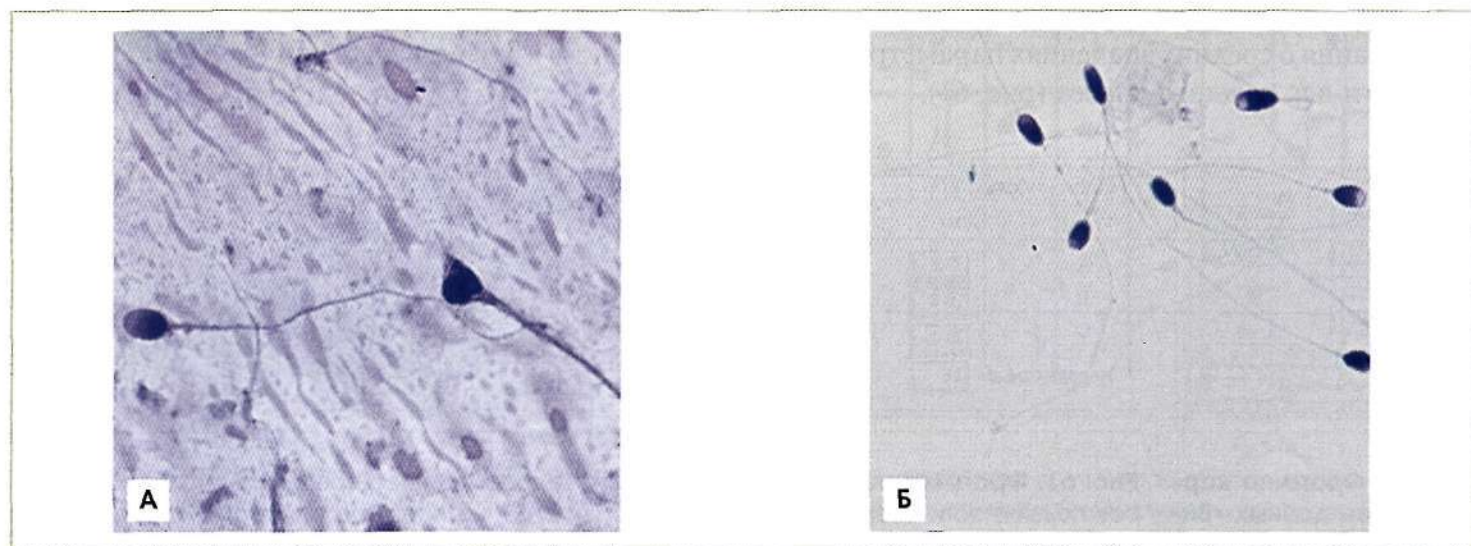


Рис. 62. Микроскопическая картина препаратов, приготовленных из эякулята с повышенной вязкостью до (А) и после (Б) отмывания 0,9% раствором NaCl

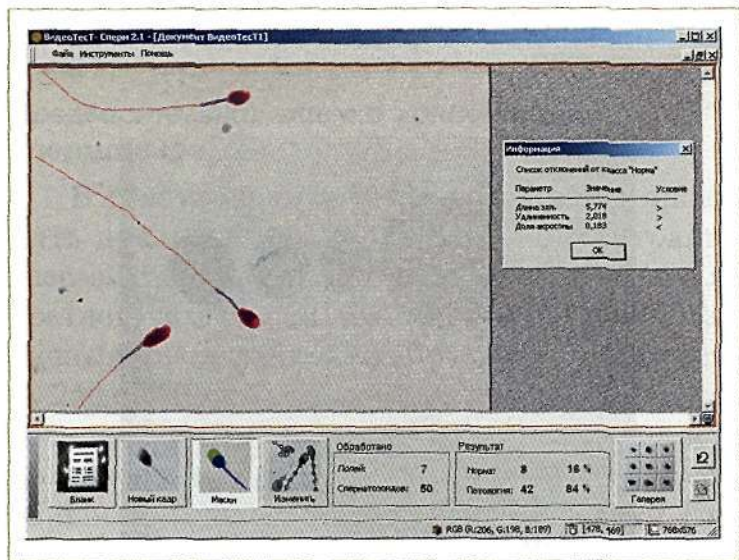


Рис. 63. Исследование морфологических параметров сперматозоидов с помощью компьютерной программы «Видеотест-СПЕРМ». У выделенных сперматозоидов измеряются следующие параметры: длина и ширина головки; форма, удлиненность и асимметрия головки; заостренность головки спереди и сзади; средняя яркость и насыщенность головки (эти параметры используются для отделения сперматозоидов от посторонних объектов); доля площади акросомы; длина, ширина и площадь средней части; длина и отклонение хвостика

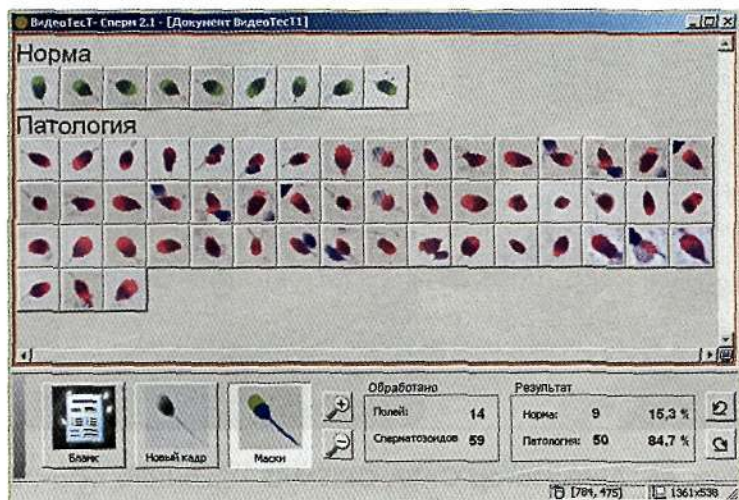


Рис. 64. Галерея нормальных и патологических форм сперматозоидов, выстраиваемая для каждого просмотренного препарата программным комплексом «Видеотест-СПЕРМ». Классификация сперматозоидов на нормальные и патологические производится на основании измеренных параметров: длина, ширина, форма и удлиненность головки; асимметрия головки и ее заостренность спереди и сзади; доля площади акросомы

И заключительное преимущество, но далеко не последнее по значимости, – возможность проводить контроль качества, что при рутинном способе исследований довольно проблематично.

Однако методу CASA присущи *определенные недостатки*.

В силу технического несовершенства применяемого оборудования анализаторам свойственна ошибка в распознавании неподвижных сперматозоидов. С неподвижными сперматозоидами могут быть ошибочно спутаны клетки сперматогенеза, лейкоциты, дебрис и др.

Другой недостаток – узкий аналитический диапазон определения концентрации сперматозоидов (примерно от 20 до 60 млн в мл).

Следующий недостаток – отсутствие четких критериев оценки результатов исследования. Спорным остается вопрос о параметре, применяемом в качестве оценочного. Так, по данным, опубликованным датскими исследователями, в анализаторе CRISMAS используется критерий VCL. За норму принято значение $VCL \geq 25$ мкм/с, концентрация прогрессивно-подвижных – более 50 млн. Большинство же исследователей группы ESHRE (наиболее распространенные анализаторы фирмы «Hamilton Thorne») используют параметр VSL, так как он меньше зависит от применяемого оборудования.

Технология CASA постоянно совершенствуется. Основные направления: совершенствование техники, уменьшение габаритов, цены, упрощение работы, введение сервисных возможностей; совершенствование программного обеспечения и алгоритмов математического анализа; выведение стандартных критериев и норм, привязка их к клинической медицине, совершенствование программ контроля качества исследований.

Сегодня существует достаточно большое предложение анализаторов. В первую очередь нужно выделить системы «закрытого типа», где вся «начинка» находится в одном корпусе. Преимуществом такого анализатора является высокое качество и надежность, меньшее занимаемое место и более удобная эксплуатация. Представителем такого типа анализаторов является наиболее известный и распространенный в мире анализатор CASA (рис. 65) – Hamilton Thorne (США, Hamilton Thorne Research, www.hamiltonthorne.com/research/spermanalysis/ivos.htm).

К недостаткам таких анализаторов можно отнести, как правило, необходимость приобретения расходных материалов (одноразовых счетных камер).



Рис. 65. Анализатор CASA IVOS Hamilton Thorne «закрытого типа»

Другая группа анализаторов представляет классическую схему: видеомикроскоп и компьютерная система. Преимущество таких анализаторов – возможность использования микроскопа и для других целей. Однако сопряжение быстродействующей видеосистемы с высоким разрешением и стандартного микроскопа составляет некоторые проблемы, поэтому качественные показатели таких анализаторов обычно несколько ниже. Впрочем, такие анализаторы обычно значительно дешевле, а для исследования можно пользоваться стандартными многократными счетными камерами. Самыми известными представителями второй группы анализаторов являются анализатор CASA CRISMAS (рис. 66) (IMAGE HOUSE, Дания, www.ihmedical.com), анализаторы фирм «Celltrack» (США), «АТМ» (Австрия) и др. К этой категории анализаторов относится система «Видеотест-СПЕРМ» (ВидеоТест, С.-Петербург, www.videotest.ru), подробно представленная выше.

Внедрение технологии CASA в андрологических лабораториях и широкий обмен данными и опытом применения позволят стандартизировать методику, выбрать оптимальные параметры и кри-



Рис. 66. Анализатор CASA CRISMAS «открытого типа», в основе которого используется принцип анализа треков движения сперматозоидов

терии для применения ее в практике центров вспомогательной репродукции. Существующие коммерческие предложения позволяют собрать модульную установку CASA, приобрести или создать соответствующее программное обеспечение. Доступные референтные видеозаписи позволяют проводить контроль правильности работы анализатора.

Концентрация сперматозоидов

Предварительная оценка концентрации сперматозоидов

В рекомендациях ВОЗ предлагается проводить предварительную оценку концентрации сперматозоидов в нативном препарате. При 400-кратном увеличении диаметр поля зрения в различных микроскопах варьирует в пределах между 250 и 400 мкм, что соответствует 1–2,5 нл при толщине препарата 20 мкм. Подсчитать диаметр поля зрения можно с помощью окуляр-микрометра или по решетке счетной камеры. Объем 1 нл соответствует 10^{-6} мл.

Если число сперматозоидов в поле зрения, соответствующем 1 нл, менее 15, эякулят разводят теплым ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) физиологическим раствором 1:5, если 15–20 – 1:10, 40–200 – 1:20, более 200 – 1:50 или 1:100.

В том случае если в 1 нл присутствует всего 1–2 сперматозоида, что соответствует $1\text{--}2 \times 10^6/\text{мл}$ сперматозоидов, то существенно сделать запись о малом количестве сперматозоидов, а для определения их концентрации надо провести центрифугирование.

Если число сперматозоидов в каждом отдельном поле зрения колеблется значительно, это свидетельствует о негомогенности образца. Следует еще раз перемешать сперму и повторно провести подсчет. Если негомогенность сохраняется, то это следствие патологической консистенции и разжижения образца, агрегации сперматозоидов в слизи или их агглютинации. Эти изменения должны быть отмечены в бланке.

Исследование концентрации сперматозоидов

Для подсчета концентрации сперматозоидов можно использовать разнообразные счетные камеры. Чаще всего используются камера Горяева с подсчетом предварительно разведенных образцов (рис. 67) или камера Маклера (Осипова) для подсчета сперматоцитов без предварительного разведения (рис. 58).

Преимущество камер без предварительного разведения – наблюдение сперматозоидов в естественной среде собственной спермоплазмы, сокращение времени подсчета, одновременный подсчет концентрации отдельных категорий. Такие камеры используются в анализаторах CASA.

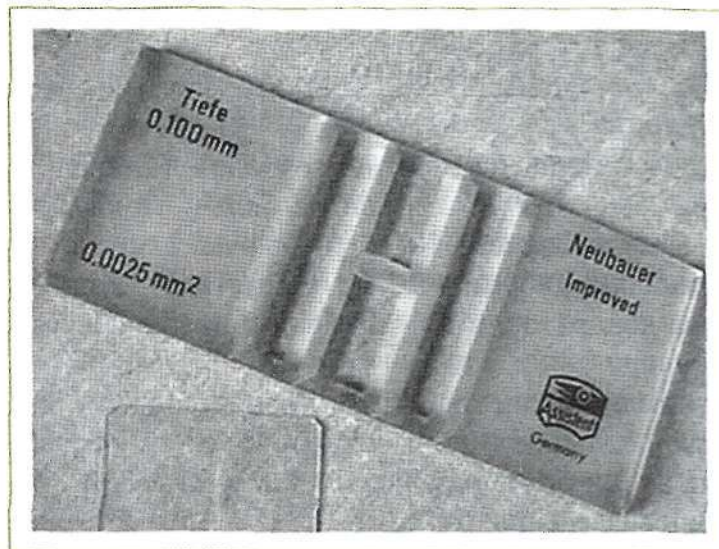


Рис. 67. Гемоцитометрическая камера Нейбауэра (отечественный аналог – камера Горяева) с подсчетом с предварительным разведением

Недостатки при визуальном анализе в таких камерах – сложность подсчета подвижных сперматозоидов, высокая стоимость, высокая погрешность подсчета (выше, чем у гемоцитометрических камер).

Подсчет количества клеточных элементов спермы в камере Горяева

Для обездвиживания сперматозоидов и разведения спермы можно использовать 5% NaCl или раствор Барбагалло (7 мл 40% формалина и 93 мл 0,85% раствора NaCl). Так как эякулят имеет повышенную вязкость, то для взятия точного объема рекомендуется использовать стеклянные пипетки, автоматические семплеры с коническим наконечником могут привести значительную погрешность при работе с вязкими растворами. В настоящее время доступны так называемые «позитивно-перемещающие» пипетки со сменными одноразовыми наконечниками (например, PDP-Lab-systems), применяемые для ПЦР в работе с вязкими жидкостями.

Согласно рекомендациям ВОЗ подсчет проводят в 2 камерах и результат определяют как среднее 2 определений.

Если сперма богата сперматозоидами, то ее разводят в 10–20 раз. В камере Горяева подсчитывают сперматозоиды в 5 больших квадратах по диагонали камеры. Считают только те спермато-

зоиды, головки которых лежат внутри квадратов. Расчет при разведении эякулята в 10 раз ведут по формуле:

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

где А – количество сперматозоидов в 5 квадратах, 250 – 1/250-объем одного большого квадрата камеры Горяева, 10 – степень разведения спермы, 1000 – 1000 мкл в 1 мл эякулята, 5 – количество квадратов, в которых подсчитаны сперматозоиды.

Если количество сперматозоидов в эякуляте очень большое – полизооспермия, сперму разводят в 40 и более раз. В расчетах учитывают степень разведения.

Разведение спермы в пробирке:

- 20 мкл спермы + 0,38 мл фиксирующей жидкости (разведение в 20 раз);
- 20 мкл спермы + 0,78 мл фиксирующей жидкости (разведение в 40 раз);
- 20 мкл спермы + 1,58 мл фиксирующей жидкости (разведение в 80 раз).

Если количество сперматозоидов в исследуемом эякуляте (эякулят почти прозрачный) резко снижено, а подвижность их сохранена, в 1 мл эякулята вносят 1 каплю фиксирующей жидкости, аккуратно, без пены размешивают и заполняют счетную камеру и считают сперматозоиды в 5 больших квадратах. Расчет ведут по формуле:

$$X = \frac{A \times 250 \times 1000}{5} = A \times 50\,000.$$

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

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

Если сперматозоидов очень мало (менее 1–2 в п/зр при $\times 400$), рекомендуется центрифугирование эякулята в течение 15 мин со скоростью 1500 об/мин, удаление надосадочной семенной плазмы, измерение ее объема, определение подвижности и подсчет количества сперматозо-

идов в счетной камере Горяева. В бланке-ответе отмечается, что сперма была подвергнута центрифугированию, так как этот процесс влияет на морфологию сперматозоидов.

Общее количество сперматозоидов в эякуляте рассчитывают, умножая количество сперматозоидов в 1 мл спермы на объем выделенной спермы. Например: объем выделенной спермы – 5 мл, количество сперматозоидов в 1 мл эякулята – 30 000 000:

$$30\,000\,000 \times 5 = 150\,000\,000 \text{ в доставленной сперме.}$$

У здорового мужчины в 1 мл эякулята содержится не менее 20 млн сперматозоидов. Общее количество сперматозоидов в эякуляте – не менее 40 млн.

Олигозооспермия. В 1 мл эякулята содержится менее 20 млн сперматозоидов.

Криптозооспермия – единичные сперматозоиды обнаружены (например, в осадке центрифугата), однако концентрацию их подсчитать невозможно.

Азооспермия – сперматозоиды при микроскопическом исследовании в нативном препарате и осадке эякулята, полученном после центрифугирования, не обнаружены. Могут присутствовать клетки сперматогенеза.

Аспермия – нет эякулята.

Клинические аспекты олигозооспермии

При олигозооспермии для определения истинного числа сперматозоидов необходимо произвести 2–3 контрольных подсчета с интервалом 3–4 недели.

Транзиторная и старческая олигозооспермия. У одного и того же мужчины число сперматозоидов подвержено большим физиологическим колебаниям. У лиц пожилого возраста олигозооспермия связана с процессом инволюции половых желез.

Причины истинной олигозооспермии

Обструкция семявыносящих путей (врожденная и приобретенная). Предположить наличие двухсторонней обструкции можно, если после центрифугирования спермы в осадке отсутствуют не только сперматозоиды, но и клетки сперматогенеза.

К приобретенной обструкции семявыносящих путей приводят хронические воспалительные

процессы в верхних отделах мочеполового тракта, вызванные гонококками, хламидиями, микобактериями туберкулеза.

Муковисцидоз: у таких больных сперма может не содержать сперматозоидов и клеток сперматогенеза, рН – ниже 7,0 (кислая реакция). Патология связана с нарушением функции семявыносящих путей, причем у этих пациентов также может быть обнаружена атрезия эпидидимиса и семенных пузырьков.

Тестикулярная дисфункция может привести к нарушению сперматогенеза. При непосредственном поражении яичек возникает первичный гипогонадизм. При нарушении гипоталамо-гипофизарной регуляции сперматогенеза развивается вторичный гипогонадизм.

Первичный гипогонадизм может быть врожденным и приобретенным. Врожденный гипогонадизм обусловлен наследственными генетическими аномалиями и врожденными дефектами развития.

Наследственные генетические аномалии: синдромы Клайнфелтера и Шерешевского–Тернера,

хромосомные аберрации, мутации AZF-области Y-хромосомы (синдром «только клетки Сертоли»), наследственные синдромы с нормальным кариотипом (синдром Нунена), низкая чувствительность к андрогенам.

Врожденные дефекты развития: крипторхизм, врожденный анорхизм, первичная недостаточность клеток Лейдига.

Приобретенный первичный гипогонадизм развивается при травматических или инфекционных орхитах, синдроме сдавления, варикоцеле, новообразованиях половых органов, лейкозах, злокачественных лимфомах, повреждении спинного мозга, печеночной и почечной недостаточности, после облучения, при действии токсических препаратов, психологических стрессах и у людей пожилого возраста. Диагностика приобретенного гипогонадизма складывается из анализа анамнестических данных, гормонального статуса и клинических исследований.

Вторичный гипогонадизм вызывается нарушением регуляторной функции гипоталамо-гипофизарной системы.

Исследование морфологии сперматозоидов

В окрашенных препаратах проводят последовательный подсчет 200 сперматозоидов (однократный подсчет 200 сперматозоидов предпочтительней двукратного подсчета 100 сперматозоидов). В ситуациях, когда от процента сперматозоидов с нормальной морфологией зависит постановка диагноза и выбор метода терапии, для повышения точности следует проводить двукратный подсчет 200 сперматозоидов.

Нормальные сперматозоиды

Существует множество классификаций оценки морфологии сперматозоидов. Практически с момента создания первого микроскопа Левенгуком были обнаружены сперматозоиды (Van Leeuwenhoek A., 1677) и постоянно производились попытки изучения и классификации их морфологии. Сагу (1916) указал на взаимосвязь нарушенной морфологии сперматозоида и снижения фертильности. Williams (1934) создал современное разделение сперматозоида на головку, шейку,

хвостик, дал описание акросомы. MacLeod (1951) разработал классификацию сперматозоидов. В разных модификациях эта классификация просуществовала до конца 80-х годов (на ее основе разработаны классификации ВОЗ ранних протоколов 1980 и 1987 гг.). Hofmann (1985) впервые попытался привязать классификацию сперматозоидов к клиническим показателям (так называемая Дюссельдорфская классификация). Наконец, Kruger, Menkveld (1986–1990 гг.) разработали классификацию с так называемыми «строгими критериями» (или Тайгербергская классификация), согласно которой в качестве нормальных оценивались сперматозоиды, прошедшие через цервикальный барьер. Критерии носят название «строгие», так как основной принцип анализа – или сперматозоид идеален, или патологический. К минимуму сведены понятия границы нормы. Все пограничные, субнормальные, незрелые сперматозоиды отнесены к патологии. Даны четкие границы размеров и рекомендации по морфометрии.

Поскольку неоднократные исследования подтверждают клиническую значимость оценки по «строгим» критериям (рис. 68, 69), они в настоящее время являются наиболее распространенными и рекомендованными ВОЗ для исследования эякулята.

Нормальные зрелые сперматозоиды человека имеют овальную головку, шейку и хвост (рис. 70).

При анализе морфологии головки обращают внимание на размер, форму, симметричность, размер акросомы, положение ядерной зоны и границу с акросомой, вакуолизацию. Форма головки – правильный овал с соотношением длинника к поперечнику от 2:1 до 4:3. Допускается небольшое смещение поперечника овала кпереди или кзади (не более чем на 20% длины). Радиусы длинных сторон должны совпадать (т. е. головка должна быть симметрична). Большую часть головки занимает ядро, прикрытое акросомой. Иногда нормальная головка может быть слегка заострена в постакросомальной зоне.

Акросома, или ядерная шапочка, – это просветление в верхней части головки, имеет наружную и внутреннюю мембраны, между которыми находятся протеаза, акрозин и гиалуронидаза. Ферменты акросомы способствуют проникновению сперматозоидов через прозрачную оболочку яйцеклетки (*zona pellucida*). Разрыв внешней мембраны и высвобождение указанных ферментов носят название акросомальной реакции (АР). В норме АР происходит при связывании сперматозоида с прозрачной оболочкой яйцеклетки. Существуют два основных типа нарушений, препят-

Нормальные	Прогноз образца	Классификация
>14%	Нормальный (N-normal)	Нормальный / фертильный
5–14%	Хороший (G-good)	Субфертильный / фертильный
0–4%	Плохой (P-poor)	Субфертильный

Рис. 68. «Строгие критерии» (Kruger). Критерии оценки морфологии по Тайгербергской классификации

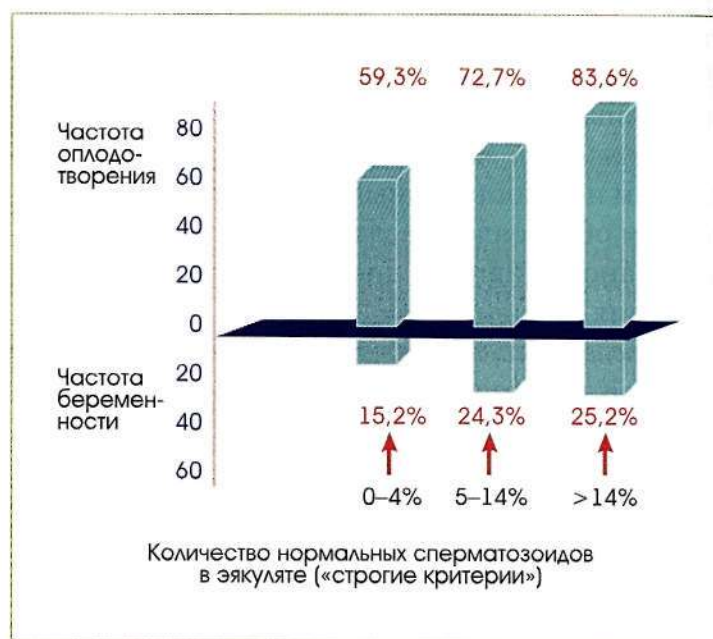


Рис. 69. Зависимость между количеством нормальных сперматозоидов в эякуляте и фертильностью спермы (Coetzee, Hum. Reprod., 1998)

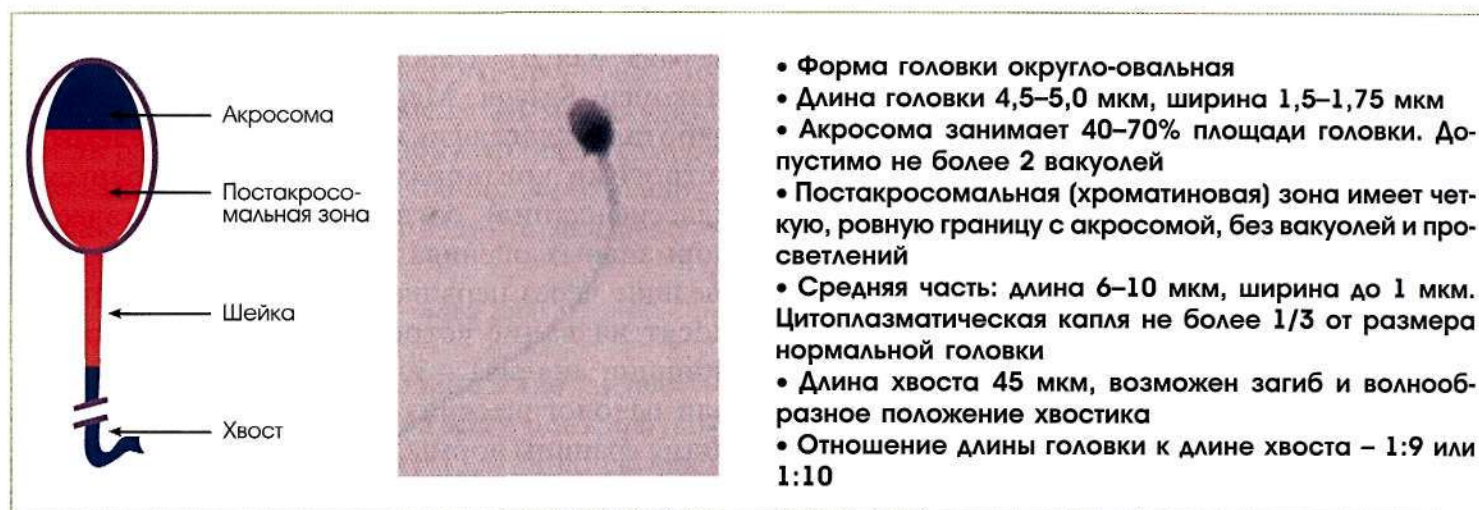


Рис. 70. Характеристика нормального (идеального) сперматозоида согласно «строгим критериям» (Kruger, Menkveld)

ствующих оплодотворению и приводящих к бесплодию:

- 1) спонтанная АР, которая происходит еще до взаимодействия сперматозоида и яйцеклетки,
- 2) отсутствие индукции АР при связывании сперматозоида с *zona pellucida*.

Для исследования АР используют как флуоресцентную микроскопию, так и проточную цитофлуориметрию с применением флуоресцирующих меченых лектинов (например, *Pisum sativum* или *Arachis hypogaea*) или моноклональных антител. Результаты исследований показали высокую прогностическую значимость определения процента сперматозоидов с завершенной спонтанной АР и завершенной АР после индукции ионофором А23187 при диагностике бесплодия, обусловленного нарушением функции сперматозоидов. При этом для бесплодных пациентов характерен высокий процент спонтанной и низкий процент индуцированной АР, в то время как у фертильных доноров отмечается высокий процент сперматозоидов с завершенной АР после индукции ионофором А23187.

Акросома должна занимать 40–70% площади головки, находиться впереди и иметь четкую ровную границу с ядром. В акросоме допустимо наличие не более двух вакуолей общей площадью не более 20% головки. В ядерной зоне вакуоли не допускаются. Около головки иногда проявляется рудиментная плазматическая мембрана (рис. 71).

Шейка и тело сперматозоида должны быть тонкими, менее 1 мкм в ширину, составлять 6–10 мкм (1,5 длины головки сперматозоида) и прикрепляться к головке вдоль ее оси. В области прикрепления не должно быть деформации (инвагинации) головки. Вместе с тем толщина средней части сперматозоида должна быть больше, чем хвостика, в противном случае речь идет о патологии – слишком тонкой шейке и средней части, что наблюдается при недоразвитии оргanelл, расположенных в средней части, главным образом митохондриального аппарата сперматозоида.

Размеры цитоплазматических капель, если они есть, не должны превышать 30% головки сперматозоида (цитоплазматическая капля – остаток цитоплазмы сперматиды).

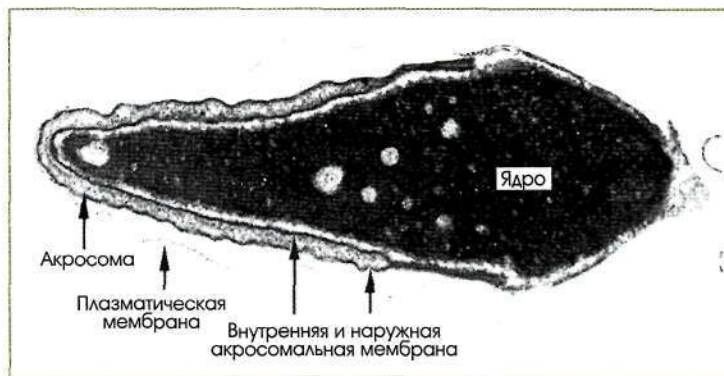


Рис. 71. Головка сперматозоида (продольный срез). Передняя часть головки покрыта акросомой, которая заполнена гомогенным веществом и содержит лизосомальные ферменты. Ядро имеет плохо различимую мембрану и гомогенный, плотно упакованный хроматин. В ядре могут быть вакуоли, которые рассматриваются как результат конденсации хроматина

Хвост должен быть прямым, одинаковой толщины на всем протяжении и несколько уже в средней части, не закрученным и иметь длину около 45 мкм. Возможен изгиб или волнообразное положение хвоста, но угол сгиба не превышает 90°. Строение хвоста или жгутика представлено на рис. 72.

Отношение длины головки к длине хвоста у нормальных сперматозоидов 1:9 или 1:10.

Сперматозоиды, у которых головка заключена в *цитоплазматическую каплю*, и те, у которых *цитоплазматическая капля* расположена на шейке в виде шарфа и по отношению к размеру головки составляет более 1/3, выделяются как патологические (ранее относились к незрелым или юным).

Сперматозоиды в нативных и окрашенных препаратах

Размеры головок сперматозоидов в окрашенных препаратах чуть меньше, чем размеры головок живых сперматозоидов в эякуляте, однако их форма существенно не меняется. Для определения понятия морфологической «нормы» сперматозоидов приняты «строгие критерии», представленные выше. Любые отклонения, все пограничные формы сперматозоидов должны быть отнесены к патологическим. Столь жесткие требования связаны с тем, что имеются данные о прогностической ценности морфологической классификации сперматозоидов для оценки результатов оплодотворения. Только полноценные сперматозоиды

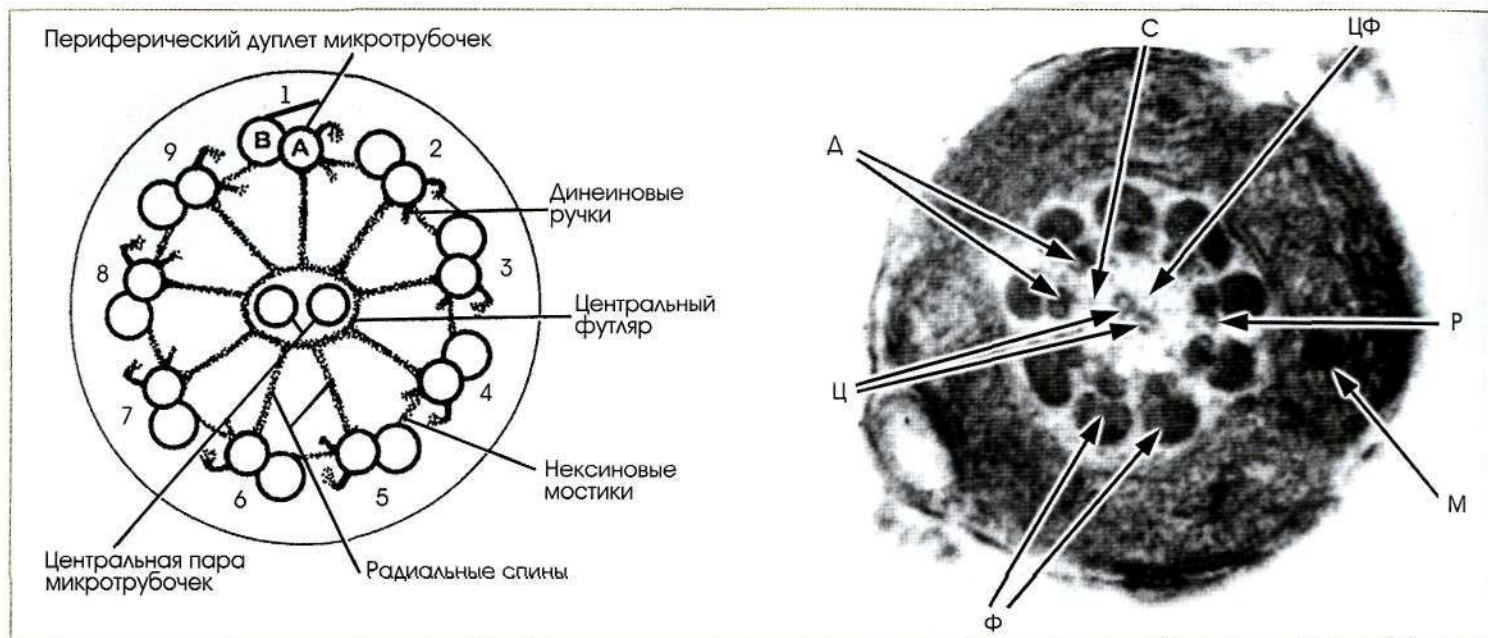


Рис. 72. Строение аксонемы жгутика сперматозоида. Состоит из 9 пар микротрубочек, расположенных по окружности (А), и центральной пары микротрубочек (Ц). Каждый из дуплетов состоит из субъединиц А и В, от субъединицы А отходят выросты, состоящие из белка динеина (Р), проявляющего Mg-зависимую АТФ-азную активность. Дуплеты также соединены тонкими нексиновыми мостиками (по названию белка). Центральная пара микротрубочек окружена центральным футляром (ЦФ) и соединяется с периферическими дуплетами радиальными спицами (С). Аксонему окружает футляр из 9 наружных плотных фибрилл (Ф) и митохондрий (М). Эта сложная структура обеспечивает скользящее движение микротрубочек, лежащее в основе движения жгутика. При отсутствии динеиновых выростов сперматозоид остается живым, но неподвижным (синдром Картагенера)

способны проникнуть в верхний отдел цервикального канала женщины. Эти сперматозоиды прошли селекцию в цервикальном секрете и могут рассматриваться как сперматозоиды нормальной морфологии. «Строгие критерии», предъявленные для оценки морфологии нормальных сперматозоидов, приняты в настоящее время большинством исследователей. В то же время даже у здоровых мужчин сперматозоиды обладают выраженной гетерогенностью и отличаются размерами и строением головки, шейки и хвоста.

Сперматозоиды с резко выраженными патологическими признаками достаточно хорошо видны в нативном препарате при увеличении $\times 400$. Более точная морфологическая оценка патологических форм сперматозоидов проводится в препаратах, окрашенных азур-эозином (по Нохту, Романовскому–Гимзе, Паппенгейму), или на приборах для окраски мазков, при микроскопии на иммерсии ($\times 900$ – 1000). В окрашенных гематологическими красителями препаратах эякулята выявляются клетки спермогенеза, остаточные тельца, плоский, переходный и цилиндрический эпителий, макрофаги, спермиофаги, лейкоциты,

эритроциты, трихомонады. У сперматозоидов прокрашиваются головка, хроматин, акросомальная зона, цитоплазматические капли на шейке и головке («космонавты»), хвост и шейка.

Количество нормальных форм в эякуляте, принимаемое за референтное значение, в разных источниках существенно различается – от 30 до 87%. В руководстве ВОЗ указывается, что *in vitro* снижение частоты оплодотворения ассоциируется с уменьшением количества морфологически нормальных сперматозоидов ниже 15%. По «строгим критериям» Kruger–Menkveld критерий нормы – 14% и более.

Патологические формы сперматозоидов

Патологические формы сперматозоидов в эякуляте показаны схематично на рис. 73 и на микрофотографиях (рис. 74–109, $\times 1000$).

Дефекты головки: большие, маленькие, конические, грушевидные, круглые, аморфные, с вакуолями в области хроматина; головки с маленькой акросомальной областью (меньше 40% площади головки), вакуолизированной акросомой

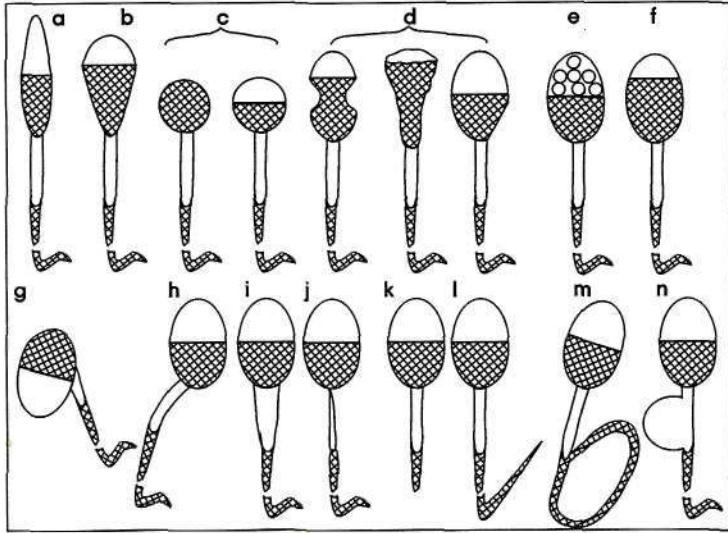


Рис. 73. Схематическое изображение патологических форм сперматозоидов в эякуляте: **a-f** – дефекты головки (**a** – коническая, **b** – грушевидная, **c** – круглая, маленькая без или с акросомой, **d** – аморфная, **e** – с вакуолями, **f** – с маленькой акросомальной областью); **g-j** – дефекты шейки и средней части (**g** – скрученная шейка, **h** – асимметричное прикрепление средней части, **i** – утолщенная средняя часть, **j** – истонченная средняя часть); **k-m** – дефекты хвоста (**k** – короткий хвост, **l** – сломанный хвост, **m** – скрученный хвост); **n** – цитоплазматическая капля занимает более 1/3 пространства головки

(если вакуолей более двух и их объем более 20% головки), с несимметрично расположенной акросомой; двойные и множественные головки, головки с компактным строением хроматина в виде ядра и т. д.

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

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

Цитоплазматическая капля, если она есть, имеет размер не более 30% головки нормального сперматозоида.

При дифференцированном морфологическом подсчете учитываются только сперматозоиды с хвостами. Не следует учитывать клетки

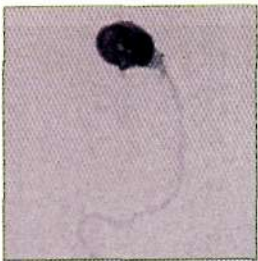


Рис. 74. Большая округлая гиперхромная головка с акросомой, занимающей более 70% ее площади, и вакуолью

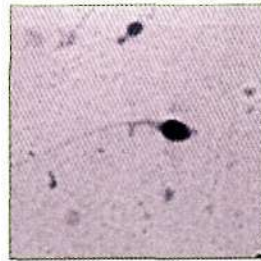


Рис. 75. Маленькая овальная гиперхромная головка без акросомы



Рис. 76. Сперматозоид без акросомы с головкой конической формы

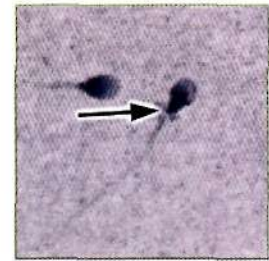


Рис. 77. Головка с несимметрично расположенной акросомой

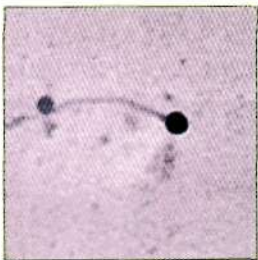


Рис. 78. Маленькая круглая гиперхромная головка без акросомы

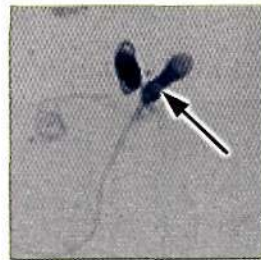


Рис. 79. Сперматозоиды с аморфной головкой, с вакуолью в области хроматина (стрелка) и крупной овальной гиперхромной головкой без акросомы и с закрученным хвостом



Рис. 80. Две головки сперматозоида без хвоста

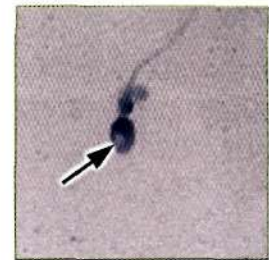


Рис. 81. Вакуоль в области акросомы и цитоплазматическая капля в виде «шарфа»



Рис. 82. Головка с маленькой акросомой

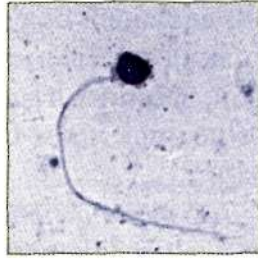


Рис. 83. Уродливая головка и компактное распределение хроматина

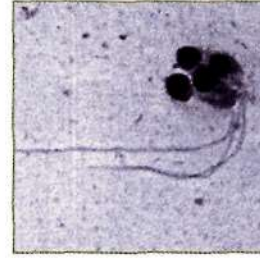


Рис. 84. Четыре головки сперматозоида с тремя хвостами. Все головки без акросомы, круглые и гиперхромные

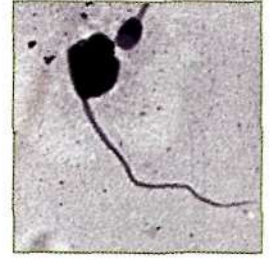


Рис. 85. Крупная уродливая гиперхромная головка без акросомы и с толстым коротким хвостом



Рис. 86. Уродливая большая гиперхромная головка и короткий хвост у сперматозоида

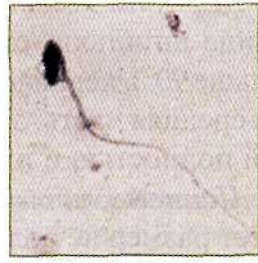


Рис. 87. Крупная гиперхромная, склоненная, вытянутая головка



Рис. 88. «Склоненная» шейка (шейка и хвост образуют к длинной оси головки угол 90°)

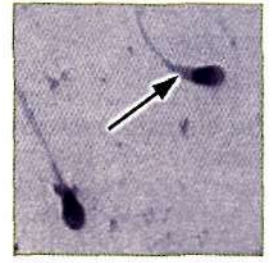


Рис. 89. Сперматозоид с утолщенной шейкой (указан стрелкой), второй сперматозоид с остатком цитоплазмы на шейке

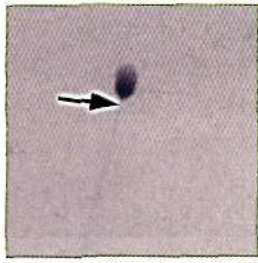


Рис. 90. Истонченная шейка сперматозоида

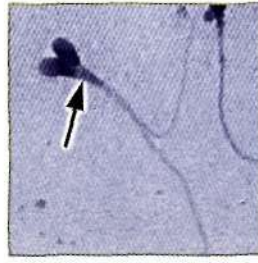


Рис. 91. Сращение двух сперматозоидов в области шейки – толстая шейка в виде конуса

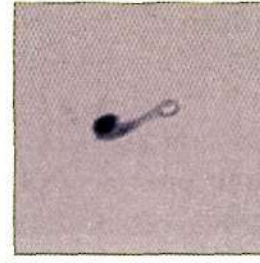


Рис. 92. Скрученная утолщенная шейка и короткий, закрученный в виде петли утолщенный хвост, гиперхромная головка без акросомы



Рис. 93. Асимметричное прикрепление шейки к аморфной головке



Рис. 94. Поломанный хвост на уровне верхней трети его длины

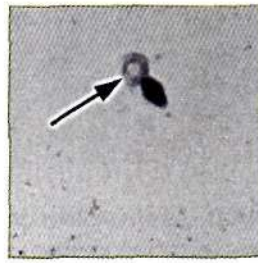


Рис. 95. Гиперхромная головка и закрученный в виде кольца хвост

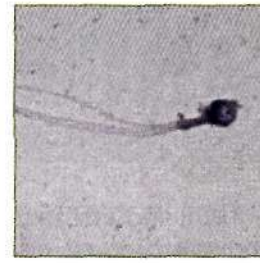


Рис. 96. Сперматозоид с уродливой круглой головкой и тремя хвостами



Рис. 97. Цитоплазматическая капля, занимающая 1/3 площади головки сперматозоида



Рис. 98. Нормальный сперматозоид с патологической цитоплазматической каплей размером с его головку

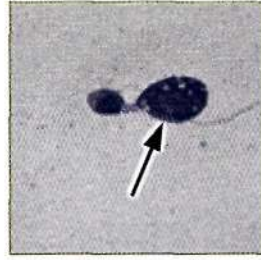


Рис. 99. Патологический сперматозоид с круглой головкой и большой гиперхромной вакуолизированной цитоплазматической каплей



Рис. 100. Патологический сперматозоид с головкой, заключенной в вакуолизированную цитоплазму в виде «скафандра»

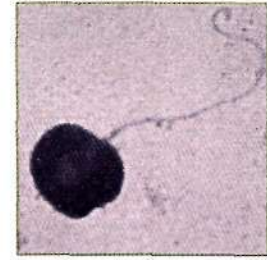


Рис. 101. Патологический сперматозоид с крупной головкой, заключенной в гиперхромную цитоплазму



Рис. 102. Патология головки и хвоста. Гиперхромная головка без акросомы и хвост, закрученный кольцом

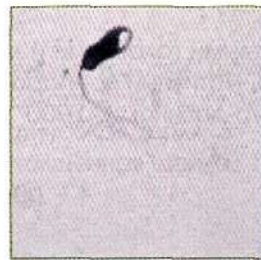


Рис. 103. Патологический сперматозоид с утолщенной шейкой, аморфная головка с асимметричной постакросомной зоной

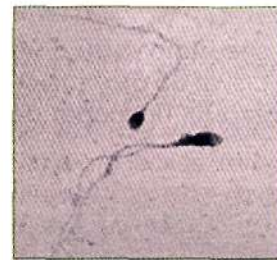


Рис. 104. Патологический сперматозоид с двумя хвостами и вытянутой головкой



Рис. 105. Патология головки, шейки и хвоста. «Склоненная» шейка, вытянутая головка и два хвоста



Рис. 106. Патология головки и хвоста. Закрученный кольцом хвост

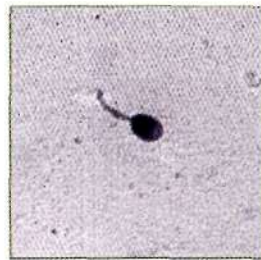


Рис. 107. Обломанный хвост у сперматозоида



Рис. 108. Утолщенная шейка сперматозоида



Рис. 109. Патология головки и шейки (утолщение с изгибом)

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

Иногда большое число сперматозоидов может иметь структурный специфический дефект – отсутствие акросомы. Для этих сперматозоидов

характерны маленькие круглые головки, хорошо видимые в нативных и окрашенных препаратах. Такое состояние носит название **глобозоспермии** (рис. 110).

Непрочная связь головки с хвостом в области базальной пластинки приводит к отделению головки от хвоста. Головки фагоцитируются клетками Сертоли, и в эякуляте можно обнаружить только отделенные хвосты или так называемые **«булавочные головки»** (рис. 111).

Тератозоспермия – увеличение количества патологических форм сперматозоидов выше ре-

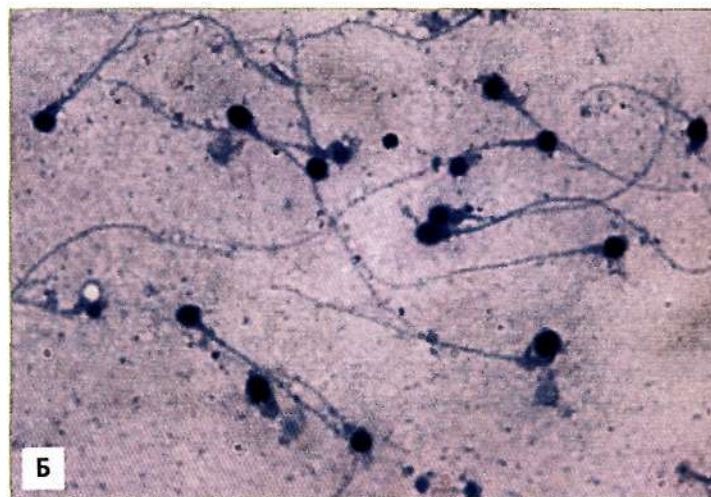


Рис. 110. Глобозооспермия: А – сперматозоиды с мелкими круглыми головками и кристаллы спермина. Равномерная светлая окраска головок свидетельствует об отсутствии акросомы. Нативный препарат, $\times 400$; Б – сперматозоиды с круглыми мелкими гиперхромными головками. Препарат окрашен азур-эозином. $\times 1000$

98

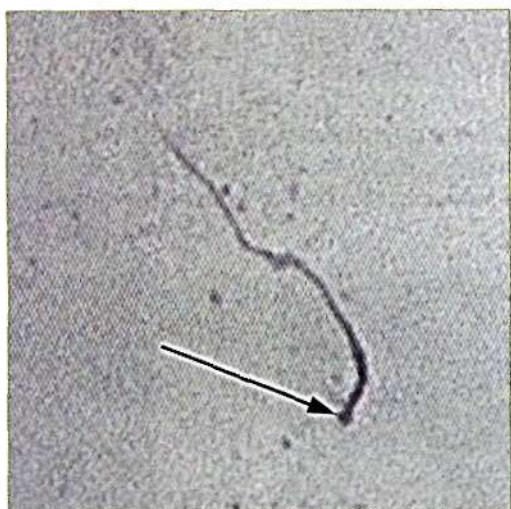


Рис. 111. «Булавочная головка», или отделенный тонкий хвост. «Булавочные головки» (отделенные хвосты) не учитываются при подсчете как дефект головки, так как очень редко в головках этих сперматозоидов кпереди от базальной пластины можно обнаружить хроматин или другие структуры. Такие «отделенные хвосты» обычно активно движутся в нативном препарате. Наличие большого числа сперматозоидов с «булавочными головками» следует отметить в бланке. Препарат окрашен азур-эозином. $\times 1000$

ферентных значений (рис. 112–115). Выраженная тератозооспермия резко снижает шансы оплодотворения и увеличивает вероятность пороков развития у плода, если оплодотворение произошло. Тератозооспермия обычно сочетается с олигозооспермией и астенозооспермией.

Увеличение содержания незрелых сперматозоидов указывает на частые половые акты, а также отмечается при варикоцеле. Количество незрелых сперматозоидов при варикоцеле снижается после операции.

Увеличение относительного количества сперматозоидов с двумя головками и двумя хвостами связывают с поражением сперматозоидов вирусом. Глобозооспермию (округление головки) объясняют полным или частичным отсутствием акросомы. В настоящее время большой

интерес вызывает корреляция специфических морфологических аномалий сперматозоидов с хромосомными aberrациями. Сейчас имеются доказательства того, что удлинённые головки, макроголовки и множественные хвосты обнаруживаются в случаях статистически достоверного повышения количества полиплоидных и анеуплоидных сперматозоидов (Lee et al., 1996). Микроделеции локуса азооспермии (AZF-локуса) длинного плеча Y-хромосомы могут давать широкий спектр аномалий. Эта патология может привести к полному отсутствию половых клеток (синдром «только клетки Сертоли») или атипии их структуры. Искусственное оплодотворение этими сперматозоидами может привести к тому, что потомок мужского пола станет носителем этой мутации.

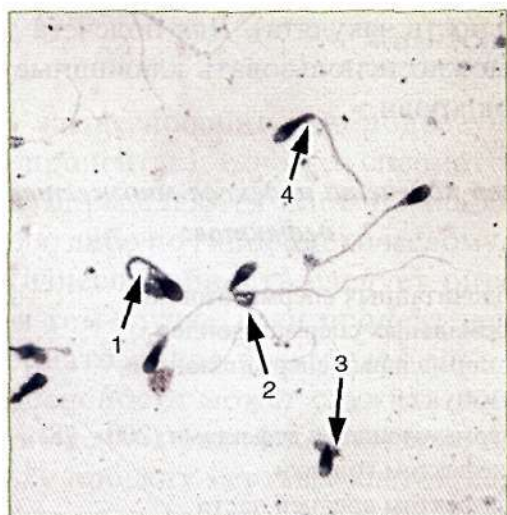


Рис. 112. Тератозооспермия. Патология головки, шейки и хвоста: 1 – сперматозоид с цитоплазматической каплей, 2 – излом шейки и большая цитоплазматическая капля, 3 – закрученный в виде кольца хвост, 4 – утолщенная шейка. Препарат окрашен азур-эозином. $\times 1000$

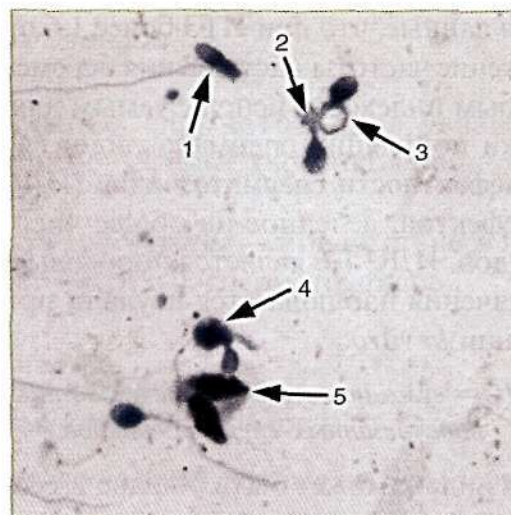


Рис. 113. Тератозооспермия. Патология головки, шейки и хвоста: 1 – утолщенная шейка и излом хвоста, 2 и 3 – патология хвоста в виде закрученного в кольцо, 4 – большая цитоплазматическая капля, 5 – две гиперхромные большие, удлиненные головки одного сперматозоида. Препарат окрашен азур-эозином. $\times 1000$

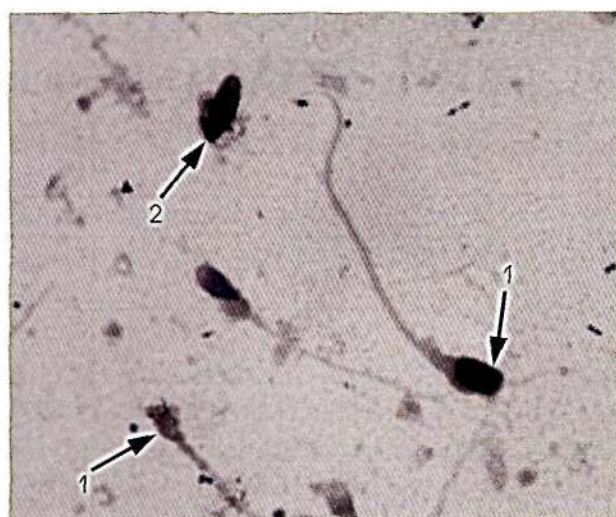


Рис. 114. Тератозооспермия. Патология головки и шейки (1), сочетанная патология головки, шейки и хвоста (2). Препарат окрашен азур-эозином. $\times 1000$

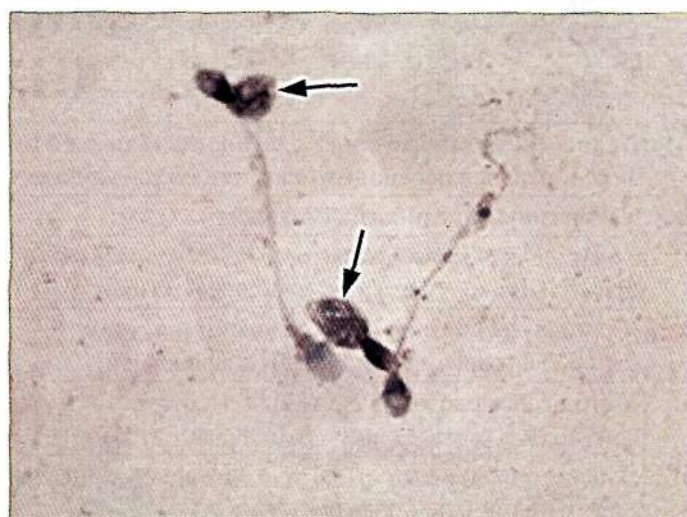


Рис. 115. Патологические сперматозоиды с большими цитоплазматическими каплями. Препарат окрашен азур-эозином. $\times 1000$

Подсчет индексов множественных дефектов сперматозоидов

Сперматозоиды с патологической морфологией часто имеют множественные дефекты. Ранее в протоколах фиксировался только 1 дефект, предпочтение отдавалось дефектам головки. В настоящее время часто подсчитывают *индекс тератозооспермии (ИТЗ, или TZI, – teratozoospermia index)*, или индекс множественных аномалий (ИМА, или MAI, – multiple anomalies index), т. е.

число дефектов, деленное на число патологических сперматозоидов:

$$\text{ИТЗ (ИМА)} = \frac{\text{суммарное число дефектов}}{\text{число сперматозоидов с дефектами}}$$

Отдельно выделяют «дефекты головки», «дефекты средней части», «дефекты хвоста». Значение ИТЗ лежит в пределах от 1,00 (каждый патологический сперматозоид имеет только 1 дефект) до 3,00 (каждый патологический сперматозоид имеет дефекты головки, средней части и хвоста).

Имеются данные, что при ИТЗ более 1,6 происходит снижение частоты наступления беременности.

Вторым индексом, используемым для характеристики популяции сперматозоидов, является **индекс дефектности сперматозоидов (ИДС)**, т. е. число дефектов, деленное на общее число сперматозоидов. ИДС 1,6 является пороговым, выше этого значения наблюдаются неудачи при оплодотворении *in vitro*:

$$\text{ИДС} = \frac{\text{суммарное число дефектов}}{\text{число подсчитанных сперматозоидов}}$$

Этот индекс может быть больше 1, если большинство сперматозоидов имеет по нескольку дефектов.

С помощью этих индексов прогнозируется функция сперматозоидов как *in vivo*, так и *in vitro*

(фертильность эякулята). Для подсчета этих индексов можно использовать клавишные счетчики клеток крови.

Пример подсчета индексов множественных дефектов:

Число подсчитанных сперматозоидов	200
Число нормальных сперматозоидов	78
Процент нормальных сперматозоидов (78/200×100)	39
Число сперматозоидов с дефектами (200 – 78)	122 (61%)
Число с дефектом головки	110 (55%)
Число с дефектом средней части	18 (9%)
Число с дефектом хвоста	16 (8%)
Суммарное число дефектов (110 + 18 + 16)	144
ИТЗ (144/122)	1,18
ИДС (144/200)	0,72



ЦИКЛЫ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ КАФЕДРЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ РМАПО (Москва)

1.	Клиническая лабораторная диагностика (врачи и биологи, стажировка, профессиональная переподготовка, общее усовершенствование)	Очное, ПП	В течение 4 месяцев
2.	Лабораторная цитология (цитологи)	Очное СУ, выездной	Месячный
3.	Контроль качества лабораторных исследований (зав. КДЛ и врачи клинич. лаб. диагностики)	Очное ТУ	2 недели
4.	Клинико-лабораторное исследование эякулята (зав. КДЛ и врачи клинич. лаб. диагностики)	Очное ТУ	2 недели
5.	Методы исследования системы гемостаза (зав. КДЛ и врачи клинич. лаб. диагностики)	Очное ТУ	2 недели
6.	Лабораторная диагностика урогенитальных инфекций (врачи клинич. лаб. диагностики)	Очное ТУ	2 недели
7.	Иммуноферментный анализ в КДЛ (зав. КДЛ и врачи клинич. лаб. диагностики)	Очное ТУ	2 недели
8.	Изоиммунологические методы исследований (врачи станций переливания крови)	Очное ОУ	Месячный
9.	Клиническая лабораторная диагностика. Гематолог. и общеклинич. исследования (зав. КДЛ и врачи клинич. лаб. диагностики)	Очное ОУ	Месячный
10.	ПЦР в КДЛ (врачи и биологи клинич. лаб. диагностики)	Очное ТУ	2 недели
11.	Определение алкоголя в биологических жидкостях	Очное ТУ	2 недели
12.	Лабораторная диагностика лимфопролиферативных заболеваний	Очное ТУ	2 недели

Все циклы длительностью 1 месяц и более дают право сдавать сертификационный экзамен. По окончании более коротких циклов выдаются свидетельства о повышении квалификации государственного образца.

Заявки для участия в циклах усовершенствования принимаются:

- по почте: 125424, Москва, а/я 32 (кафедра КЛД)
- по факсу (095) 945-84-00 или телефону (095) 945-82-22
- по электронной почте: kafedra-kdl@list.ru

Жизнеспособность сперматозоидов

Под жизнеспособностью подразумевается доля (в процентах) «живых» сперматозоидов, которые определяются либо по исключению красителя, либо по гипоосмотическому набуханию. Жизнеспособность следует определять только в том случае, если процент неподвижных сперматозоидов превышает 50%. Оценка жизнеспособности может служить контролем точности оценки подвижности сперматозоидов, поскольку процент мертвых клеток не должен превышать процента неподвижных сперматозоидов. Наличие большого количества живых, но

неподвижных сперматозоидов указывает на структурные дефекты хвостиков (синдром Картагенера).

Некрозооспермия – присутствие в эякуляте более 50% мертвых сперматозоидов.

Дифференциация живых и мертвых сперматозоидов

Суправитальная окраска по Блюму проводится для дифференциации живых и мертвых сперматозоидов.

Суправитальная окраска по Блюму**1-й вариант – только эозин**

Реактивы: эозин (К или желтый водорастворимый) – раствор 5 г/л на физиологическом растворе (WHO, 2001).

В нашей стране традиционно применяется 3% или 5% раствор эозина на дистиллированной воде.

Ход исследования

I способ. На предметном стекле смешать каплю хорошо размешанного эякулята с такой же по размеру каплей раствора эозина и покрыть препарат покровным стеклом. Исследовать препарат через 30 с при увеличении $\times 400$.

Оценку полученных результатов провести немедленно. Живые сперматозоиды – бесцветные (белые), мертвые – окрашиваются в цвет красителя.

II способ. Смешать капли спермы и раствора эозина на предметном стекле. Через 1 мин сделать мазки и высушить на воздухе. Микроскопировать под иммерсионным объективом ($\times 90$ или $\times 100$) с окуляром $\times 10$ или бинокляром. Головки живых сперматозоидов – бесцветные, мертвых – окрашены эозином в оранжево-красный цвет (рис. 116).

2-й вариант – эозин-нигрозин (модификация Блюма)

Реактивы: эозин – 3% водный раствор, нигрозин – 10% водный раствор.

Ход исследования:

- на предметное стекло нанести каплю хорошо размешанного эякулята;
- рядом поместить 2 капли раствора эозина;
- каплю спермы тщательно перемешать стеклянной палочкой с каплями эозина и выдерживать 30 с;
- добавить 3 капли раствора нигрозина, выдерживать 30 с;
- сделать пластиковым шпателем или покровным стеклом тонкие мазки, высушить и исследовать под иммерсией ($\times 900$ или $\times 1000$);
- сосчитать 100 окрашенных и неокрашенных сперматозоидов и определить процентное соотношение живых и мертвых.

Оценка теста

Живые сперматозоиды – бесцветные, мертвые – окрашены в оранжево-красный цвет. Нигрозин создает темный фон, что облегчает изучение препарата (рис. 117).

Нормальным считается эякулят, в котором $\geq 75\%$ живых сперматозоидов (в рекомендациях ВОЗ – 50% и более).

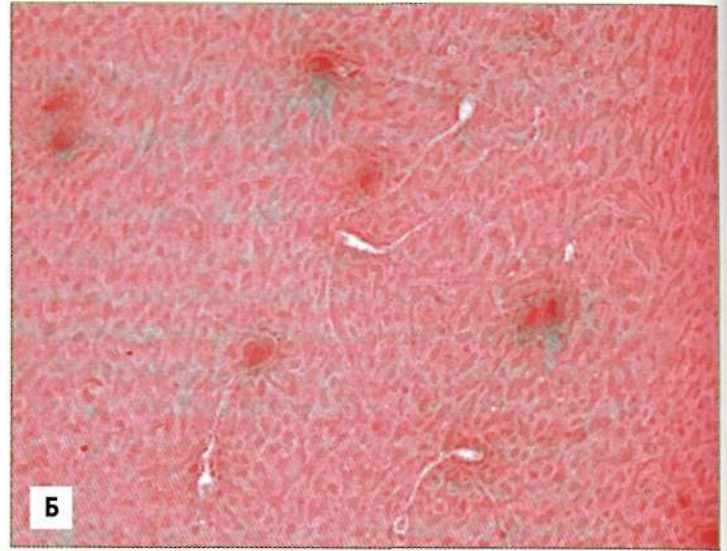
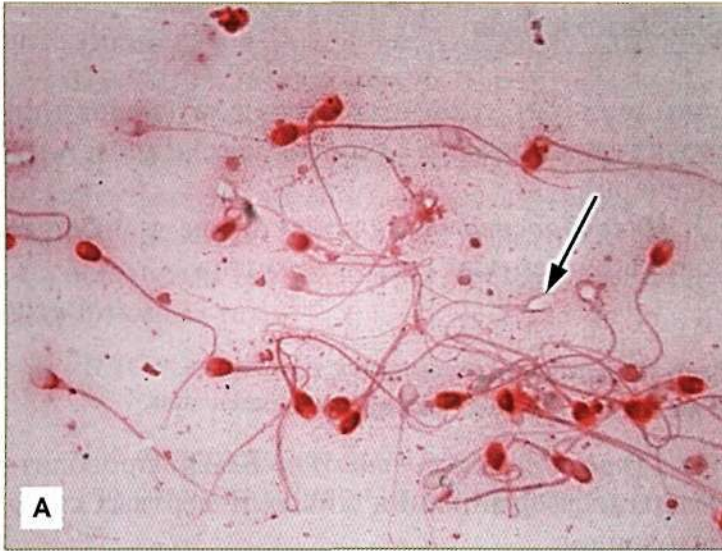


Рис. 116. Суправитальная окраска для дифференциации живых и мертвых сперматозоидов. Головки и хвосты мертвых сперматозоидов окрашены эозином в интенсивный красно-оранжевый цвет, головки живых сперматозоидов не окрашиваются и остаются бесцветными (стрелка (А) указывает на живой сперматозоид). Окраска 3% эозином по Блюму. $\times 1000$

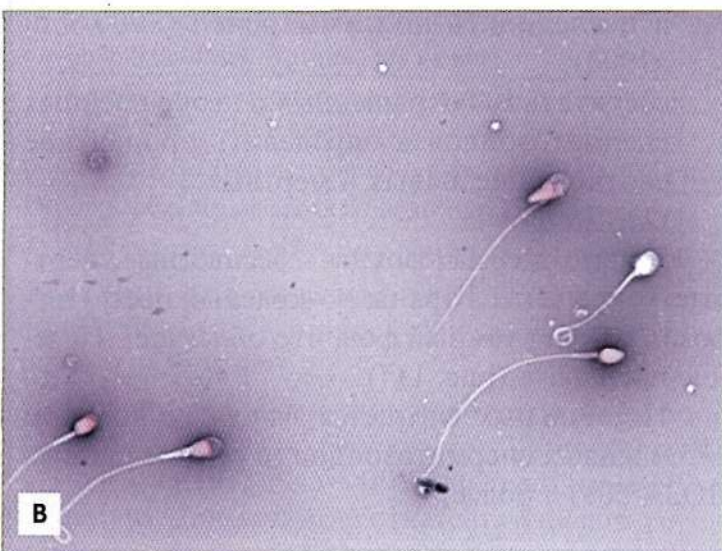
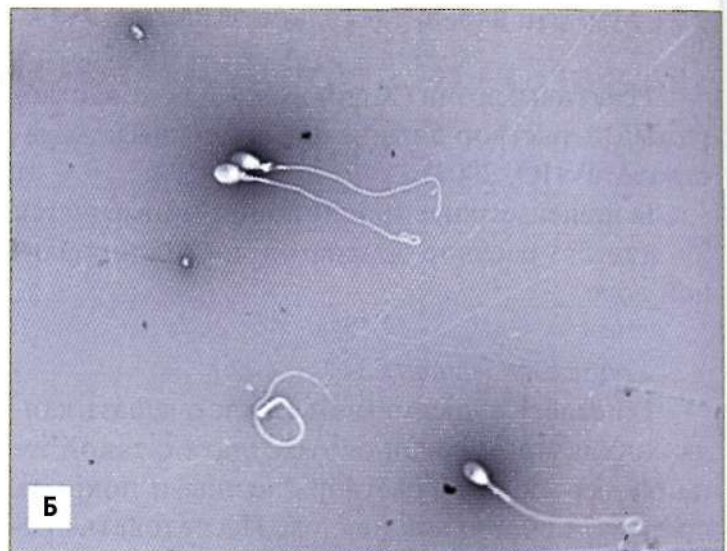
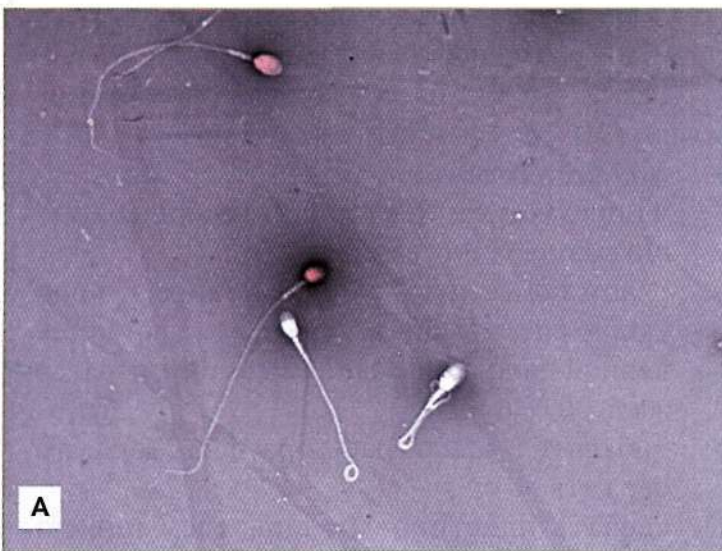


Рис. 117. Суправитальная окраска эякулята с нигрозином, создающим темный фон. Головки и хвосты мертвых сперматозоидов окрашиваются в вишнево-красный цвет, живые сперматозоиды остаются неокрашенными. Темный фон облегчает исследование препарата. Препарат, окрашенный 3% эозином и 10% нигрозином (модификация окраски по Блюму)

Тест на гипоосмотическое набухание также проводится для дифференциации живых и мертвых сперматозоидов.

Тест на гипоосмотическое набухание сперматозоидов

Раствор для теста

Растворить 0,735 г цитрата натрия дигидрата $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 1,351 г фруктозы в 100 мл дистиллированной воды, разлить в пробирки Эппендорфа по 1 мл и хранить при $t -20^\circ\text{C}$. Перед употреблением размораживать и тщательно перемешивать.

Ход исследования

Согреть 1 мл раствора в пробирке Эппендорфа в течение 5 мин при 37°C . Добавить 0,1 мл разжиженного эякулята и перемешать пипеткой. Инкубировать смесь при 37°C не менее 30 мин, но не более 120 мин и исследовать сперматозоиды в фазово-контрастном микроскопе.

Набухание сперматозоидов идентифицируют по изменению формы их хвостов (рис. 118). Считают число набухших клеток на 200 исследуемых сперматозоидов, и выводят процент набухших сперматозоидов.

двух сперматозоидов, и выводят процент набухших сперматозоидов.

Оценка теста

Результаты считаются нормальными, если произошло набухание хвоста более чем у 60% сперматозоидов. Если набухание хвоста произошло менее чем у 50% сперматозоидов, то данный образец расценивается как патологический, в котором больше половины мертвых сперматозоидов.

Примечание. Перед проведением теста на гипоосмотическое набухание необходимо подсчитать в нативном препарате количество сперматозоидов с закрученными хвостами (если они есть в эякуляте). Число сперматозоидов с закрученными хвостами вычитают из числа сперматозоидов с набухшими хвостами для получения истинного количества мертвых сперматозоидов.

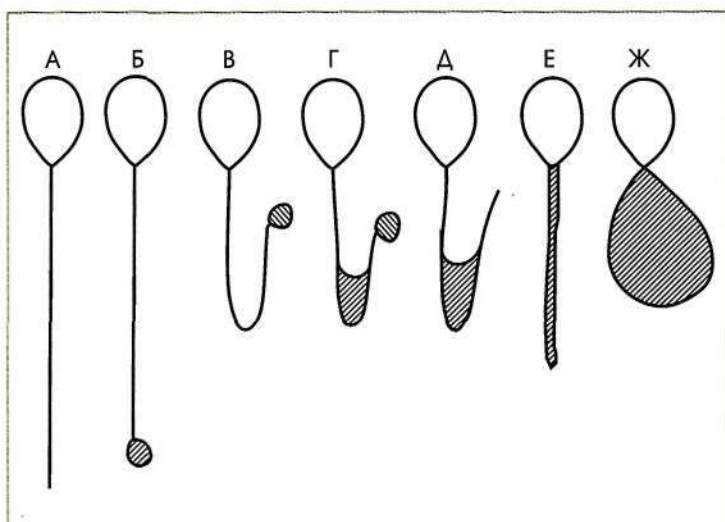


Рис. 118. Гипоосмотическое набухание сперматозоидов. Схематическое изображение морфологических изменений: А — нет изменений, Б–Ж — различные типы изменений хвоста. Заштрихованные зоны показывают участки набухания хвоста

Динамическое исследование эякулята

Динамическое исследование эякулята не вошло в стандартные протоколы исследования ВОЗ, но продолжает производиться в некоторых КДЛ.

Исследования проводятся через 3, 6 и 24 часа после получения эякулята по стандартным методикам, определяющим следующие параметры.

Через 3 и 6 часов:

- Вязкость эякулята.
- Агглютинация сперматозоидов.
- Подвижность сперматозоидов.
- Жизнеспособность сперматозоидов.

Через 24 часа:

- Вязкость эякулята.
- Агглютинация сперматозоидов.
- Подвижность сперматозоидов.
- Жизнеспособность сперматозоидов.

Круглые клетки эякулята

К круглым клеткам эякулята относят эпителиальные клетки, лейкоциты, макрофаги, незрелые половые клетки. Их количество не должно превышать 5×10^6 /мл спермы.

Лейкоциты

В норме в эякуляте содержится менее 1×10^6 /мл лейкоцитов, это преимущественно нейтрофилы. Повышенное количество лейкоцитов носит название **лейкоспермии**. В нативном препарате эякулята нейтрофилы – это круглые, сероватые, мелкозернистые клетки диаметром 14–16 мкм. В щелочной среде спермоплазмы (рН обычно 7,5–8,0) нейтрофилы выглядят несколько крупнее, чем в крови. Если рН спермы на верхней границе нормы или превышает ее, клетки разбухают еще больше, просматривается броуновское движение нейтрофильных гранул и видны сегментированные ядра. Это особенно четко видно, если на покровное стекло нанести каплю иммерсионного масла и перевести микроскоп на иммерсионный объектив ($\times 90$ или $\times 100$). Лейкоциты считают в 100 больших квадратах камеры Горяева. Расчет проводят по формуле:

$$L = \frac{a \times 250 \times 10 \times 1000}{100},$$

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

Окончательный вариант формулы: $L = a \times 25\,000$.

Если количество лейкоцитов большое, можно считать клетки в 40 больших квадратах (20 квадратов сверху сетки и 20 – внизу). Расчет вести по формуле:

$$L = \frac{a \times 250 \times 10 \times 1000}{40},$$

где a – количество лейкоцитов в 40 больших квадратах, 250 – $1/250$ -объем одного большого

квадрата, 10 – степень разведения спермы, 1000 – 1000 мкл в 1 мл спермы, 40 – количество больших квадратов.

Окончательный вариант формулы: $L = a \times 62\,500$.

В руководстве ВОЗ предлагается диагностировать нейтрофилы в сперме цитохимическими методами:

1. Метод окрашивания препарата на миелопероксидазу с использованием ортотолуидина.
2. Иммуноцитохимический метод, который позволяет дифференцировать в препарате спермы макрофаги, нейтрофилы, В- и Т-лимфоциты.

Обнаружение лейко- или пиоспермии является сигналом для проведения микробиологического исследования эякулята.

Лейкоспермия влияет на процессы, происходящие в репродуктивной системе. Лейкоциты активируются при наличии антигенной стимуляции и продуцируют большое количество активных кислородных радикалов, таких, как анион супероксида O_2^- , перекись водорода H_2O_2 , гидроксильный радикал $(OH)^\cdot$. Эти радикалы накапливаются во время антибактериальных окислительно-восстановительных процессов. Лавинообразное нарастание радикалов кислорода с участием нейтрофилов обозначается как «дыхательный взрыв», при этом перекись водорода под влиянием миелопероксидазы превращается в агрессивную гипохлорную кислоту (НОСl). Этот процесс направлен на уничтожение попавших в организм бактерий. Кислородные радикалы способны повреждать и мембраны сперматозоидов. В то же время низкая концентрация кислородных радикалов не влияет на жизнеспособность сперматозоидов, но приводит к уменьшению их подвижности за счет влияния на сократительные белки жгутика. При высокой концентрации кислородные радикалы спермы вступают в реакцию с фосфолипидами клеточных мембран, индуцируют перекисное окисление жирных кислот в мембранах и приводят к гибели клеток. В эякуляте человека сперматозоиды также образуют кислородные радикалы, но нейтрофилы являются более мощ-

ным источником кислородных радикалов. Кислородные радикалы необходимы для нормального процесса оплодотворения. В норме повреждающий эффект кислородных радикалов в сперме практически отсутствует, так как сперматозоиды и спермоплазма имеют защитную систему, регулирующую концентрацию кислородных радикалов. Защитная система состоит из ферментов и ряда антиоксидантов, таких, как альбумин, глутатион, пируват и витамины Е и С. В семенной плазме мужчин, страдающих бесплодием и астенозооспермией, содержание антиоксидантов значительно ниже, чем у фертильных мужчин.

Лейкоспермия и, вероятно, агрегация нейтрофилов при их нормальной концентрации в спер-

ме указывают на воспалительный процесс в органах репродуктивной системы.

Лейкоспермия снижает вероятность оплодотворения. На фоне лейко- и пиоспермии выявляются инфекционные и вирусные агенты, вызвавшие воспаление; следовательно, лейко- и пиоспермия – маркеры возможной передачи инфекции между половыми партнерами (рис. 119–122).

Клетки сперматогенеза (незрелые половые клетки)

Клетки сперматогенеза – это сперматогонии, сперматоциты и сперматиды. В сперме чаще всего встречаются сперматоциты и сперматиды на

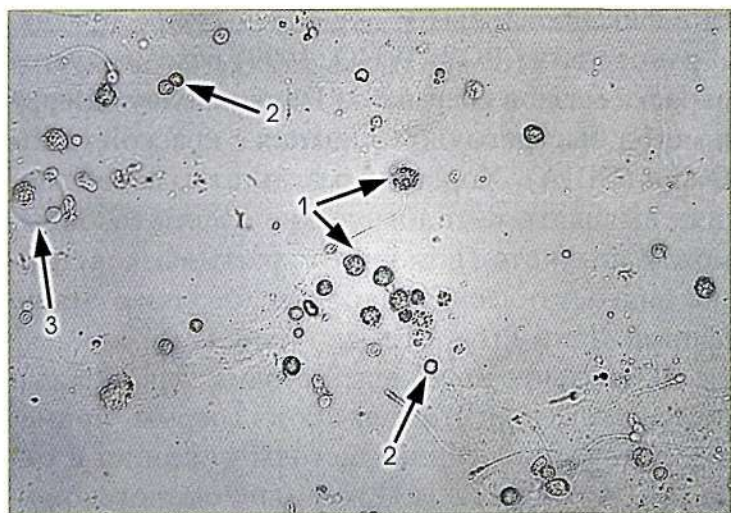


Рис. 119. Пиоспермия. Лейкоциты (1), эритроциты (2), клетка сперматогенеза (3). Нативный препарат. $\times 400$



Рис. 120. Пиоспермия. Нейтрофилы в окрашенном азур-эозином препарате. $\times 1000$

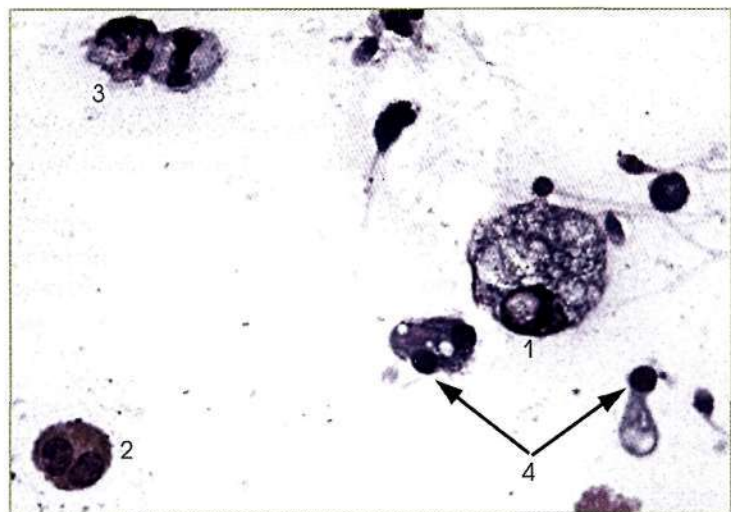


Рис. 121. Макрофаг (1), эозинофил (2), нейтрофилы (3), сперматиды (продолговатая и двухъядерная) (4)

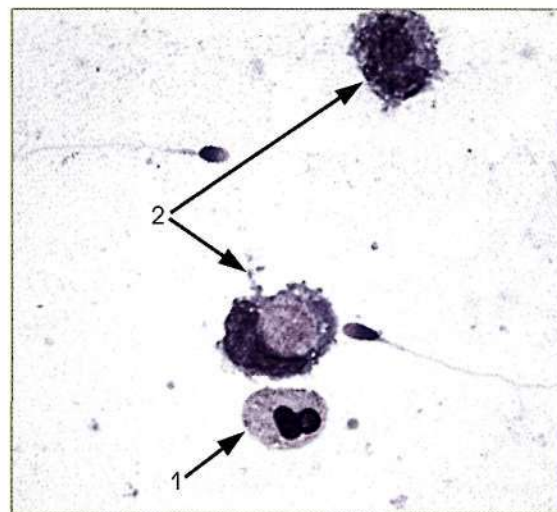


Рис. 122. Хронический простатит. Нейтрофил (1), макрофаги (2)

разных стадиях созревания. Сперматогонии встречаются редко.

Клетки сперматогенеза хорошо различимы в нативном препарате. Это клетки правильной круглой формы, разных размеров (размером с нейтрофил или в 2–3 раза и больше) и характеризующиеся плотной, гомогенной консистенцией цитоплазмы, на фоне которой иногда просматриваются одно или несколько ядер округлой формы и плотной структуры (рис. 123).

В руководстве ВОЗ рекомендуется считать количество круглых клеток в камере, в тех же полях зрения, в которых считают сперматозоиды. Расчет проводят по формуле:

$$C = \frac{N \times S}{100},$$

где C – концентрация клеток данного типа в млн/мл, N – количество клеток данного типа, подсчитанных в тех же полях зрения, что и 100 сперматозоидов, S – концентрация сперматозоидов в млн/мл.

Например, если число клеток сперматогенеза или лейкоцитов 10 на 100 сперматозоидов, концентрация сперматозоидов – 120×10^6 /мл, то концентрация клеток сперматогенеза или лейкоцитов будет равна:

$$C = \frac{10 \times 120 \times 10^6 / \text{мл}}{100} = 12 \text{ млн/мл}.$$

Если во всем препарате не обнаружено клеток сперматогенеза (лейкоцитов), рекомендуется сделать запись, что в исследуемом материале меньше 3,7 клетки на единицу объема (верхний предел 95% доверительного интервала при значении 0 составляет 3,7 по распределению Пуассона). Согласно этому пределу чувствительности метода микроскопии число клеток сперматогенеза меньше 3700 в 1 мл составляет наименьший лимит обнаружения этих клеток для образца объемом 1 мкл.

Способы окраски мазков спермы

Дифференциация круглых клеток нормальных и патологических сперматозоидов проводится в фиксированных и окрашенных препаратах. В руководстве ВОЗ (WHO, 1999) рекомендуется окраска мазков спермы по Папаниколау, Шорпу и метод быстрого окрашивания с краской «Diff-Quik» (США). Хорошие результаты, позволяющие выявлять патологические сперматозоиды, можно получить с помощью окраски мазков спермы диагностическим набором «Spermac Stain» (фирма «Ferti Pro», Бельгия) (рис. 124).

В лабораториях нашей страны для окраски препаратов, приготовленных из спермы, применяют унифицированные методы фиксации и окраски. Это окраска по Нохту или Романовскому-Гимзе с предварительной фиксацией мазков ме-

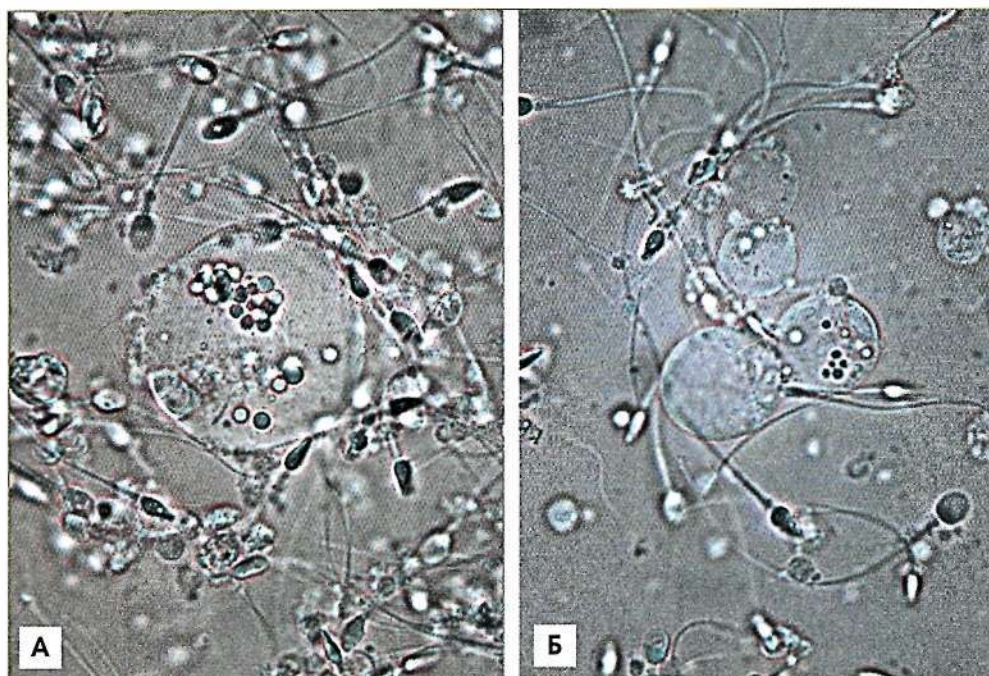


Рис. 123. Клетки сперматогенеза в эякуляте. Нативные препараты. $\times 1000$:

А – крупная правильной круглой формы клетка сперматогенеза с плотной гомогенной цитоплазмой, небольшим эксцентрически расположенным ядром (в центре препарата). В цитоплазме видны мелкие капли жира как результат дегенерации клетки. Фон – сперматозоиды;

Б – небольшие правильной круглой формы клетки сперматогенеза. Цитоплазма во всех клетках гомогенная, плотная. В одной клетке видны мелкие капли жира

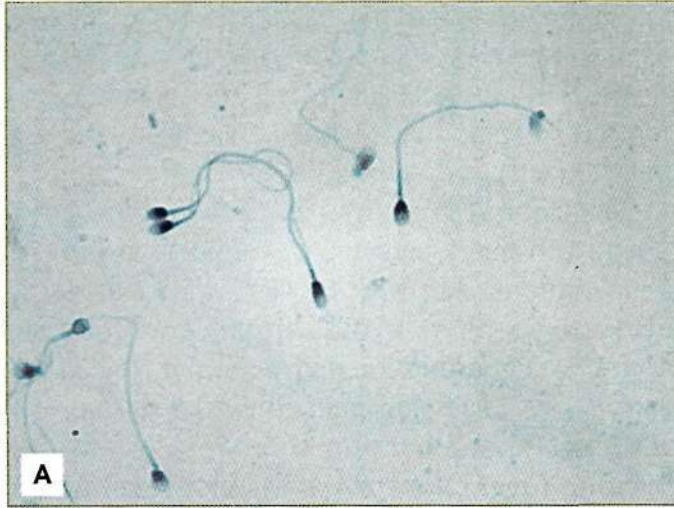


Рис. 124 (А). В препарате представлены нормальные и патологические сперматозоиды. Хроматин головок окрашен в темно-розовый и вишневый цвет, шейка и хвост – в светло-зеленый. Контур головки окрашен в бледно-зеленый цвет, а акросома не прокрашивается. Препарат окрашен красителем «Spermac Stain». ×1000

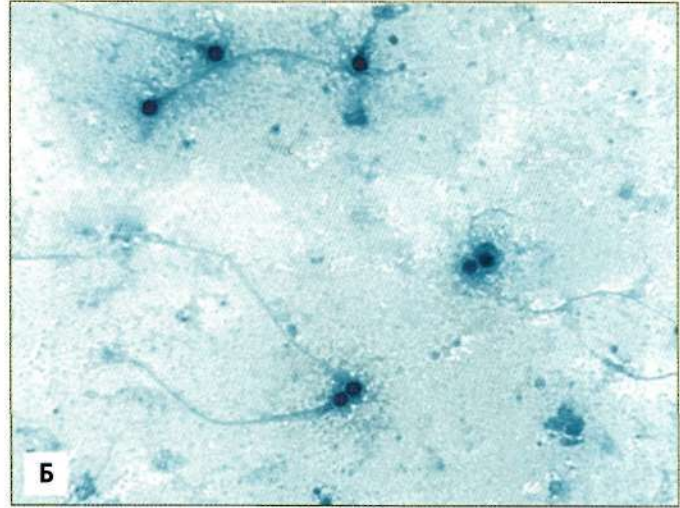


Рис. 124 (Б). Сперматозоиды с круглыми, гиперхромными головками без акросомы. Окраска эякулята красителем «Spermac Stain». Глобозооспермия. ×1000

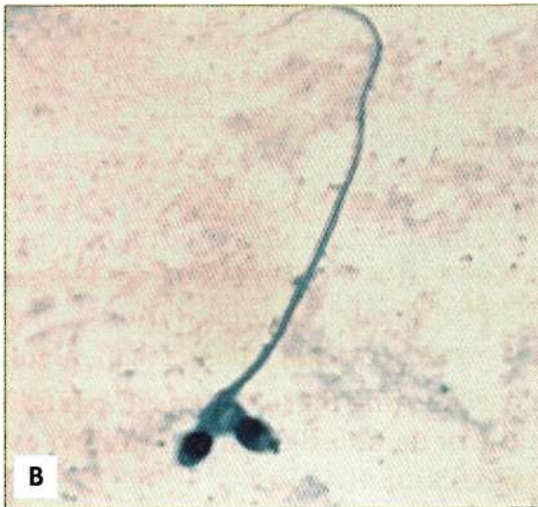


Рис. 124 (В). Сперматозоид с двумя головками. Окраска эякулята красителем «Spermac Stain». ×1000



Рис. 124 (Г). Сперматозоиды с кольцевидными хвостами. Окраска эякулята красителем «Spermac Stain». ×1000

тиловым или этиловым спиртом; окраска по Паппенгейму–Крюкову с фиксацией мазков фиксатором-красителем типа Мая–Грюнвальда и последующей докраской препаратов рабочим раствором краски Романовского–Гимзы или Нохта. Хорошо прокрашиваются сперматозоиды краской набора «Квик-Дифф» фирмы «Абрис+» (Санкт-Петербург) (рис. 125).

Нами рекомендовано окрашивание мазков, приготовленных из спермы, на аппаратах для ок-

раски мазков крови (например, «Гема-Тек», фирма «Bayer»), в которых в течение 10 мин мазки фиксируются и окрашиваются комбинированным фиксатором-красителем «Гемокрафикс» (фирма «Эко-Лаб», г. Электрогорск Московской области).

Приготовление мазков

На обезжиренное предметное стекло нанести каплю аккуратно (без пены) размешанной спермы или каплю осадка спермы, полученного пос-

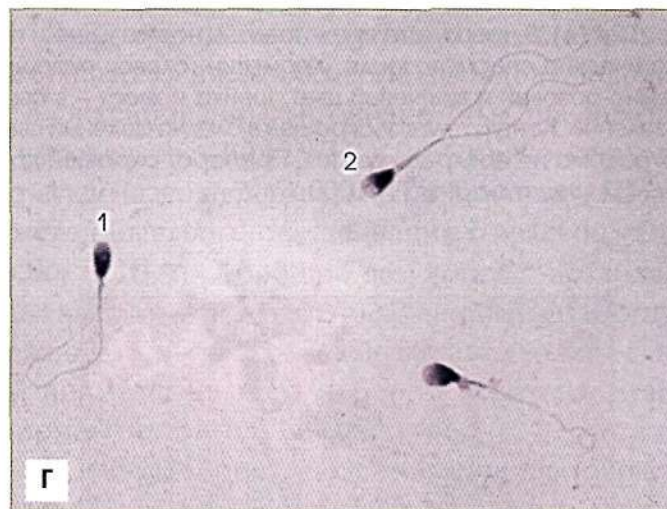
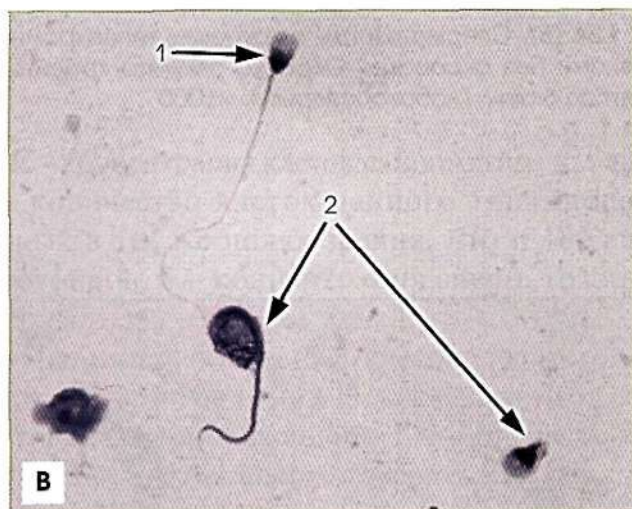
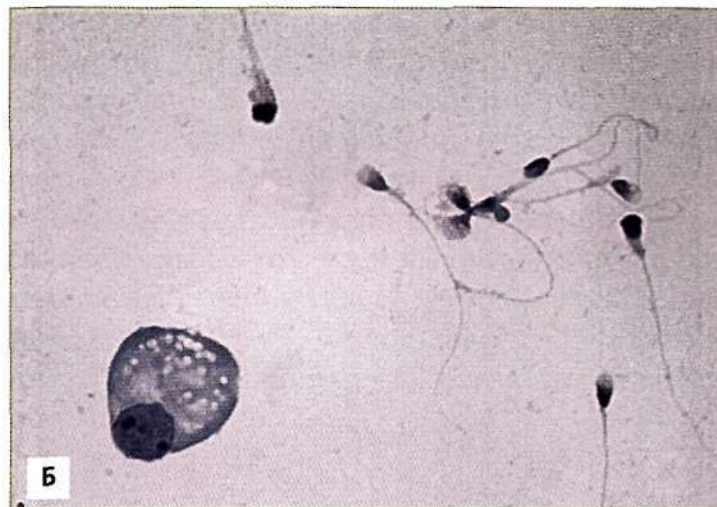
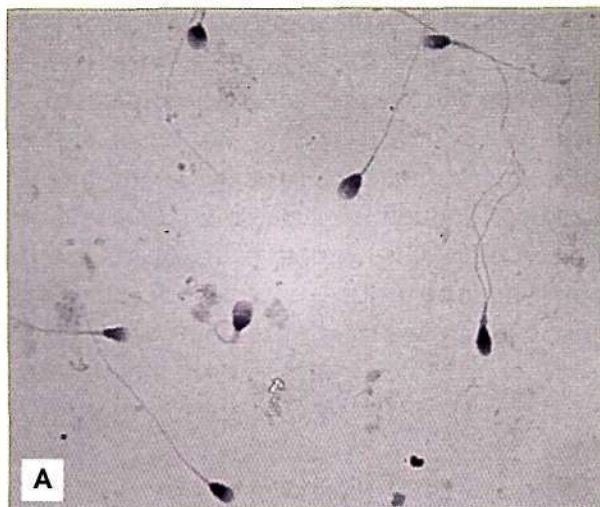


Рис. 125: А – сперматозоиды; Б – клетка сперматогонеза с вакуолизированной цитоплазмой; В и Г – нормальные (1) и патологические сперматозоиды (2). Окраска эякулята красителем «Квик-Дифф». $\times 1000$

ле ее центрифугирования. С помощью пластикового шпателя или покровного стекла легким движением сделать мазок.

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

Морфология клеток в препаратах спермы, окрашенных азур-эозином

Сперматогонии

Сперматогонии – неоднородная популяция, состоящая из клеток типа А и В, которые располагаются между клетками Сертоли на базальной мембране семенных канальцев и прикрыты сверху этими же клетками. Сперматогонии – это клетки размером 7–10 мкм, имеют округлое ядро с диффузным хроматином и узкий ободок цитоплазмы базофильного цвета (рис. 126).

Сперматогонии типа А подразделяются на темные и светлые клетки. Для ядер обоих вари-

антов клеток типа А характерно преобладание мелкозернистого хроматина.

Сперматоциты

Сперматоциты I порядка, так же как сперматогонии, очень редко, при выраженном нарушении процессов сперматогенеза могут быть обнаружены в эякуляте. Это крупные клетки овальной или круглой формы диаметром 15–17 мкм с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. Нити хромати-

на в ядре рыхло переплетаются между собой, образуя извитую петлистую структуру. На фоне хроматина можно видеть единичные ядрышки. Цитоплазма базофильная, достаточно широким ободком окружает ядро (рис. 127). В результате деления из этих клеток образуются сперматоциты II порядка.

Сперматоциты II порядка – клетки круглой формы, диаметром 14–21 мкм, имеют одно или два ядра округлой формы. Нити хроматина переплетаются между собой рыхло. Ядрышки не видны. Цитоплазма базофильная, с сероватым оттенком, достаточно широким ободком окружает ядро. Зона просветления вокруг ядра (ядер) иногда не видна. Могут встречаться многоядерные клетки и дегенеративные изменения в ядрах (рис. 128–134).

Сперматиды

В результате деления сперматоцитов II порядка образуются дочерние клетки – **сперматиды** (рис. 135–143).

Сперматиды в семенных канальцах яичек не делятся, а постепенно созревают, образуя сперматозоиды. Вначале это небольшие, диаметром 10–12 мкм клетки круглой формы с круглым гомогенным, плотным ядром. Затем они увеличиваются в размерах, постепенно вытягиваются, удлиняются, ядро уменьшается, становится пикнотичным и сдвигается к проксимальному концу клетки (концу, обращенному к стенке семенного канальца). Проксимальный конец ядра заостряется и одна из двух центриолей, расположенных вблизи закругленного конца ядра, формирует хвост.

Форма сперматид круглая, неправильная, полигональная или вытянутая. Эти изменения формы происходят в процессе созревания сперматид в семенном канальце. Соотношение ядра и цитоплазмы резко сдвинуто в сторону цитоплазмы. Ядра круглой или неправильной округлой формы, могут занимать 1/3 или 1/6–1/10 часть клетки и располагаться центрально (круглые сперматиды) или эксцентрично. Хроматиновая структура в более крупных ядрах частично сохранена, мелкие ядра могут быть гиперхромными, бесструктурными или частично сохранять хроматиновую структуру. Более крупные ядра обычно располагаются в цитоплазме центрально, мелкие – эксцентрично, практически у края цитоплазмы. Цитоплазма вакуолизирована, ок-

раска цитоплазмы сперматид полихроматофильная (от серовато-синей до серой).

При нарушении сперматогенеза сперматиды в большом количестве обнаруживаются в эякуляте, иногда в сочетании со сперматоцитами II порядка и остаточными тельцами (остатками цитоплазмы сперматид).

Остаточные тельца

Остаточные тельца (фрагменты цитоплазмы сперматид) образуются в процессе формирования сперматозоида или разрушения сперматид (неэффективный спермиогенез). В норме процесс созревания сперматозоида и освобождения его от цитоплазматической капли происходит в семенном канальце, где клетки Сертоли или эпителиальные клетки эпидидимиса фагоцитируют эти остатки цитоплазмы. Остаточных телец в нормальном эякуляте практически нет. Появление остаточных телец в эякуляте обычно сочетается с появлением клеток сперматогенеза (сперматид без или в сочетании со сперматоцитами). Окраска остаточных телец в одном препарате может быть различных оттенков – от базофильной до серой (рис. 144–145).

Макрофаги

Это большие клетки круглой формы, диаметром 20–36 мкм с эксцентрично или центрально расположенным ядром. В окрашенных азур-эозинном препаратах цитоплазма широким ободком окружает ядро больше с одной стороны, вакуолизирована. В вакуолях можно видеть лейкоциты, фрагменты ядер или целые ядра разрушенных клеточных элементов, бактерии (рис. 146).

В сперме здорового мужчины макрофагов нет. Макрофаги появляются в сперме больных, страдающих хроническими специфическими и неспецифическими воспалениями простаты, эпидидимиса и др.

Спермиофаги – макрофаги, фагоцитирующие сперматозоиды. Это округлые клетки диаметром до 30–40 мкм, в цитоплазме которых в нативном и окрашенном азур-эозином препаратах видны в основном головки сперматозоидов. Иногда можно видеть спермиофаги, заполненные головками сперматозоидов, а на поверхности цитоплазмы по окружности, как лучи, видны хвосты частично заглоченных сперматозоидов (рис. 147–151).



Рис. 126. Сперматогония. $\times 1000$



Рис. 127. Сперматоцит I порядка. $\times 1000$



Рис. 128. Сперматоцит II порядка. $\times 1000$



Рис. 129. Сперматоцит II порядка. $\times 1000$



Рис. 130. Сперматоцит II порядка. $\times 1000$



Рис. 131. Двухъядерный сперматоцит II порядка. $\times 1000$

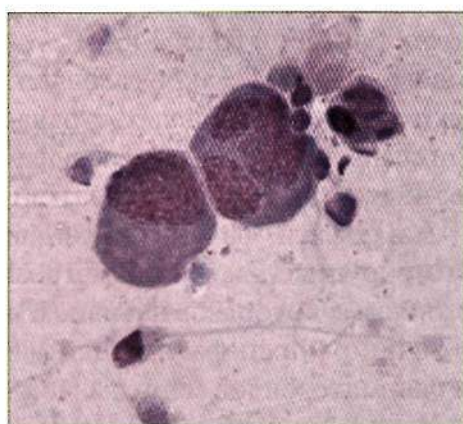


Рис. 132. Клетки сперматогенеза (сперматоциты II порядка) у больного после лечения гормонами. $\times 1000$



Рис. 133. Дегенерация ядра в клетке сперматогенеза. $\times 1000$

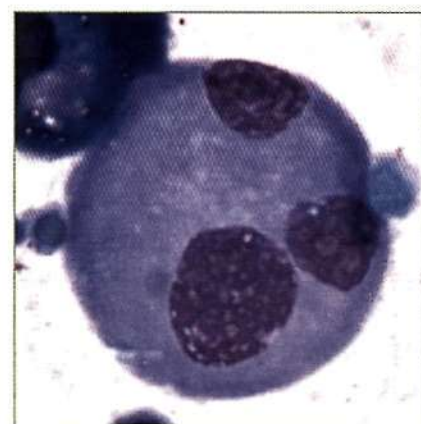


Рис. 134. Многоядерная клетка сперматогенеза. $\times 1000$



Рис. 135. Круглые сперматиды. $\times 1000$

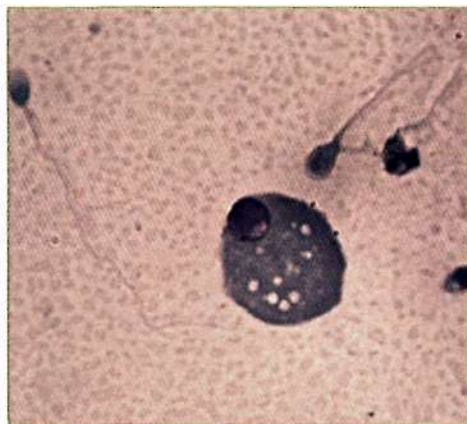


Рис. 136. Круглая сперматида с вакуолизированной цитоплазмой. $\times 1000$



Рис. 137. Продолговатая сперматида с пикнотичным маленьким ядром, расположенным эксцентрично, многоядерная клетка сперматогенеза. $\times 1000$

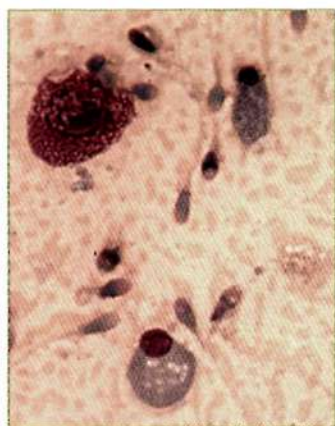


Рис. 138. Две продолговатые сперматиды. $\times 1000$

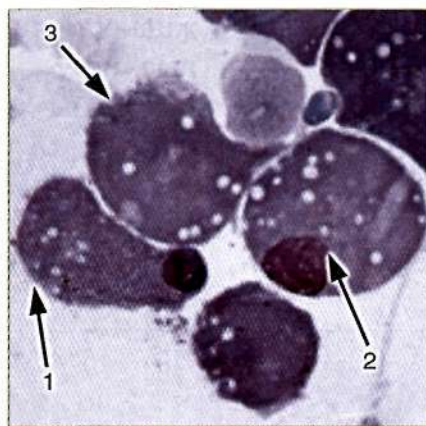


Рис. 139. Сперматиды (1 – продолговатая, 2 – круглая, 3 – остаточное тельце). $\times 1000$

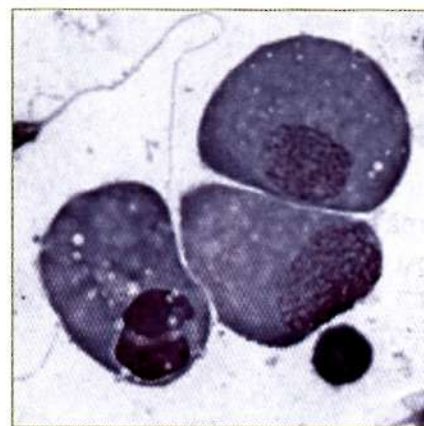


Рис. 140. Сперматиды. $\times 1000$



Рис. 141. Сперматида. $\times 1000$



Рис. 142. Двухъядерная сперматида. $\times 1000$

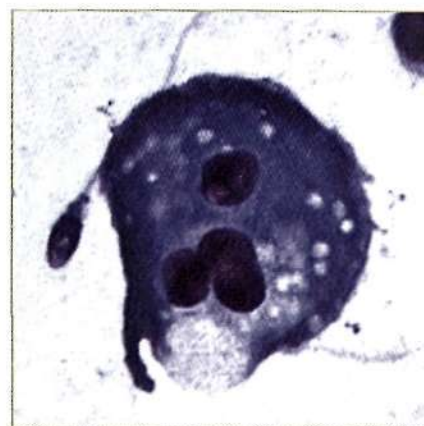


Рис. 143. Многоядерная сперматида. $\times 1000$

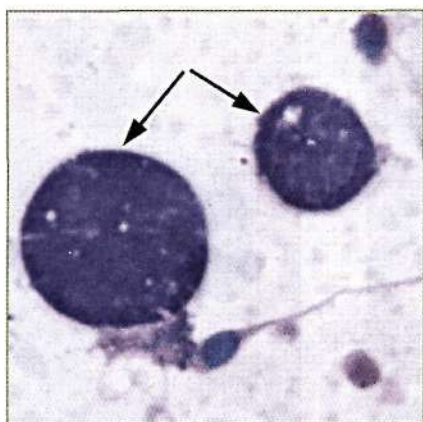


Рис. 144. Остаточные тельца. $\times 1000$

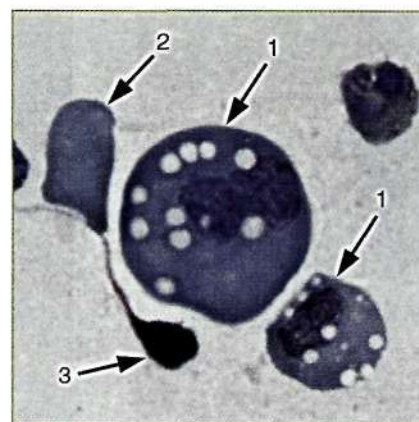


Рис. 145. Сперматиды (1), остаточные тельца (2), патологический сперматозоид (3). $\times 1000$

Появление в сперме спермиофагов обусловлено ее длительным застоем в эпидидимисе в результате редких эякуляций, выходом из эпидидимиса неполноценных или старых сперматозоидов.

Эритроциты

В нативном и окрашенном азур-эозином препаратах эритроциты выглядят так же, как и в любом другом биологическом материале. В натив-

ном препарате это правильной круглой формы бледно-желтые клетки диаметром 7–9 мкм с просветлением в центре, лежащие разрозненно или скоплениями. При перемещении клеток с током жидкости видно, что эритроциты – это уплощенные, похожие на двояковогнутую линзу клетки. В препарате, окрашенном азур-эозином, эритроциты – безъядерные клетки розоватого цвета.

В сперме здоровых мужчин эритроцитов нет. Появление эритроцитов в эякуляте – *гемоспермия*. Гемоспермия может быть *истинной и ложной*.

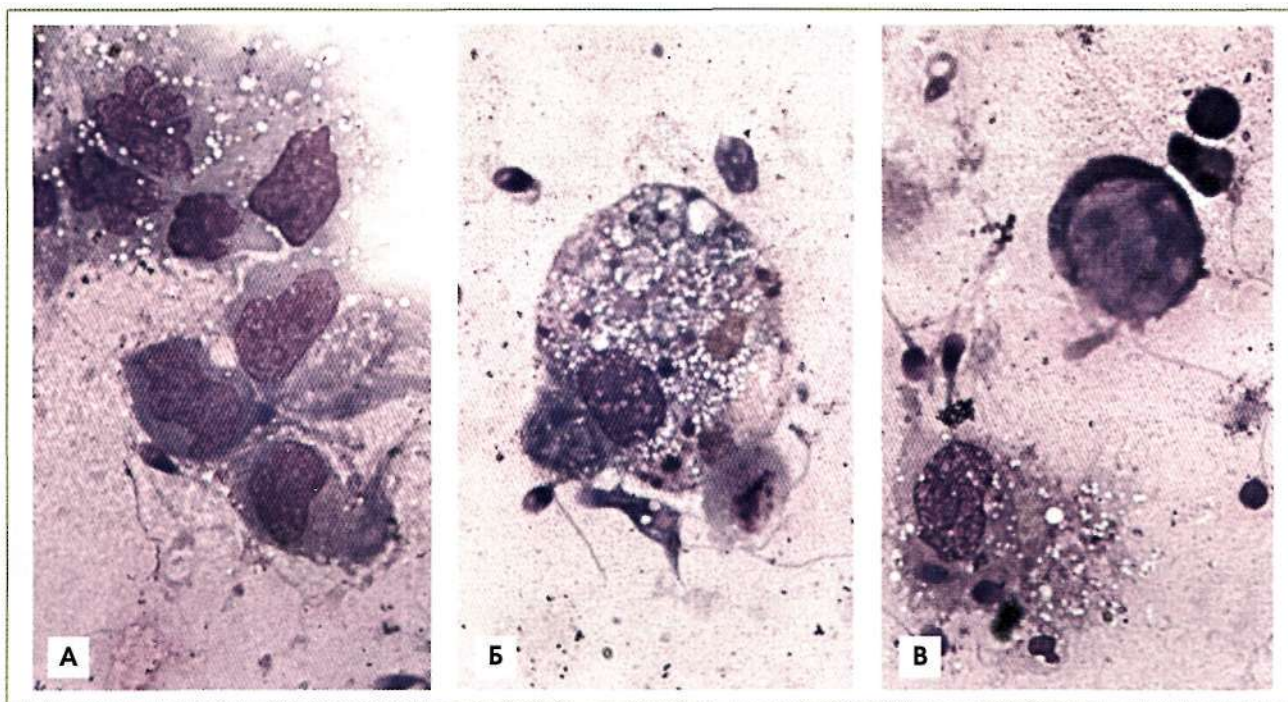


Рис. 146. Макрофаги в эякуляте – крупные клетки с эксцентрично расположенными ядрами, вакуолизированной цитоплазмой, содержащей фагированные остатки клеточных элементов. Сочетание макрофагов с нейтрофилами указывает на хронический воспалительный процесс. Сперма получена от больного хроническим простатитом. Препарат окрашен азур-эозином. $\times 1000$

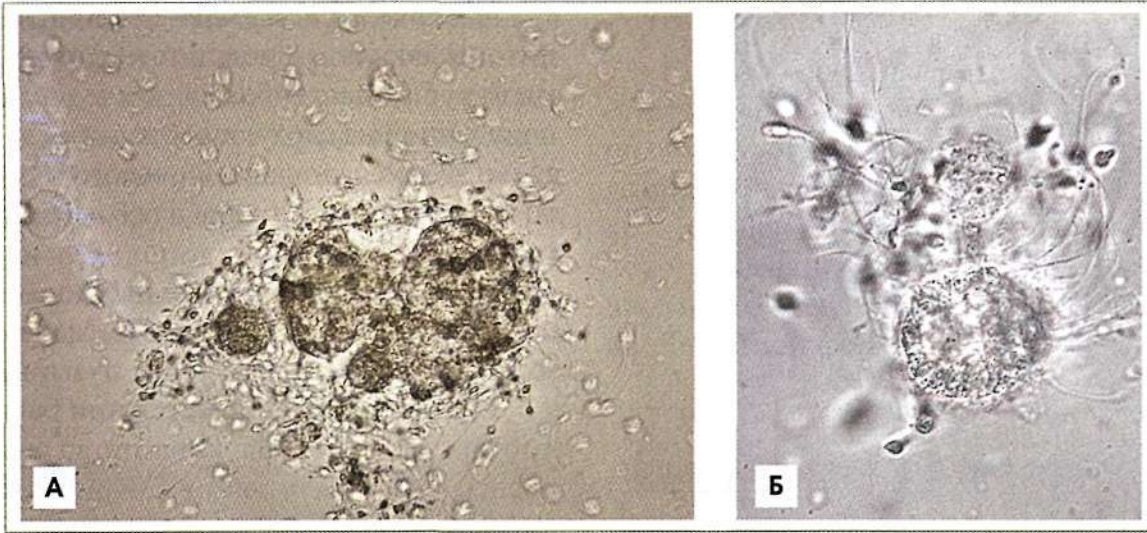


Рис. 147. Спермиофаги. Частично фагированные и адгезированные на мембране макрофагов сперматозоиды образуют плотный клубок. Нативный препарат. А – $\times 400$; Б – $\times 1000$

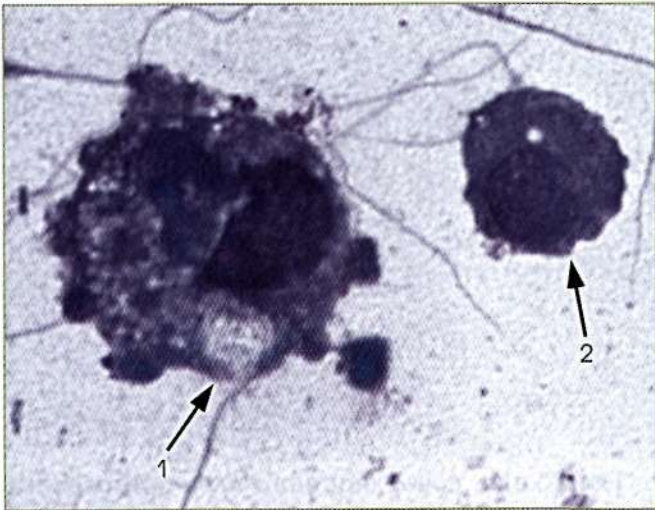


Рис. 148. Спермиофаг (1) и клетка сперматогенеза (2). $\times 1000$

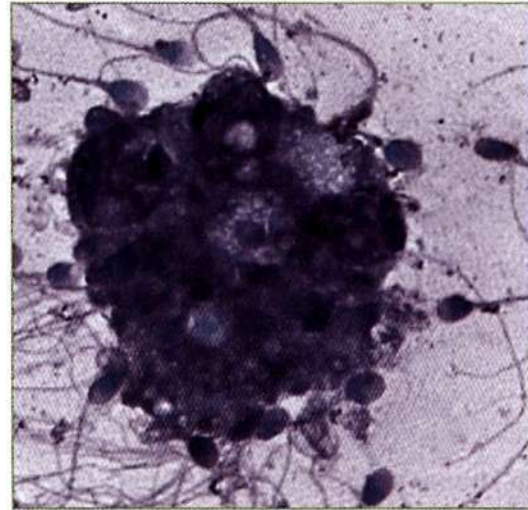


Рис. 149. Спермиофаг. $\times 1000$

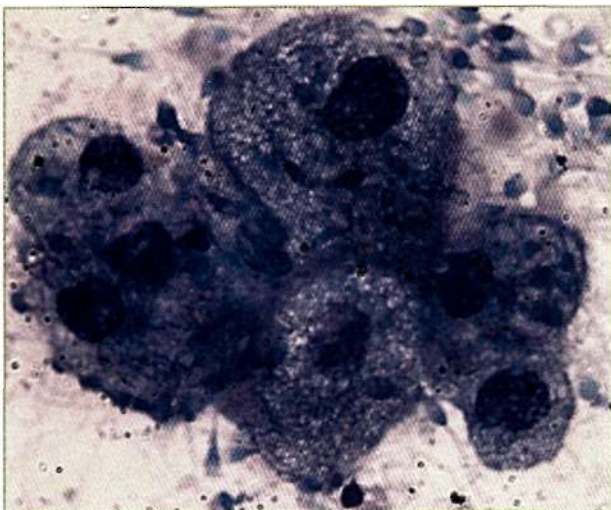


Рис. 150. Спермиофаги. $\times 1000$

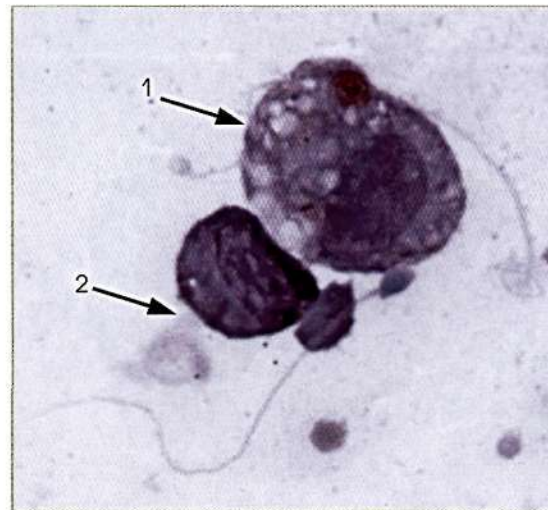


Рис. 151. Спермиофаг (1) и клетка сперматогенеза (2). $\times 1000$

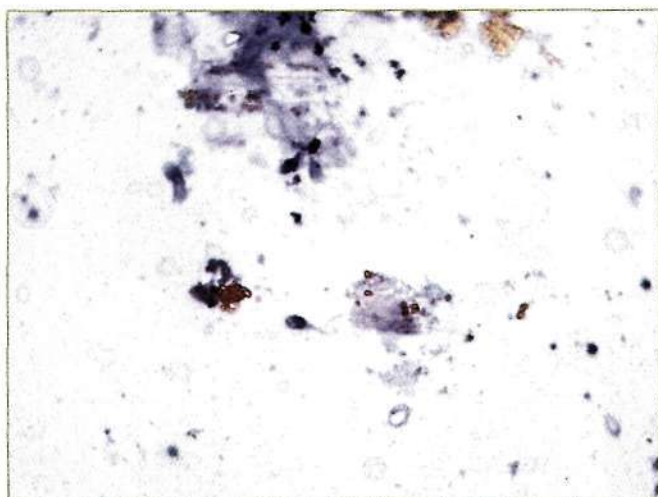


Рис. 152. Кристаллы гематоидина в препарате, окрашенном азур-эозином. $\times 1000$



Рис. 153. Клетки поверхностного слоя ороговевающего плоского эпителия на фоне сперматозоидов. Нативный препарат. $\times 1000$

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

Истинная гемоспермия наблюдается при воспалении добавочных половых желез, новообразованиях (опухоль семенных пузырьков).

Гематоидин образуется при распаде гемоглобина без доступа кислорода в гематомах, расположенных в тканях. Кристаллы гематоидина – это золотисто-желтые или желто-оранжевые слегка вытянутые в длину ромбы и/или

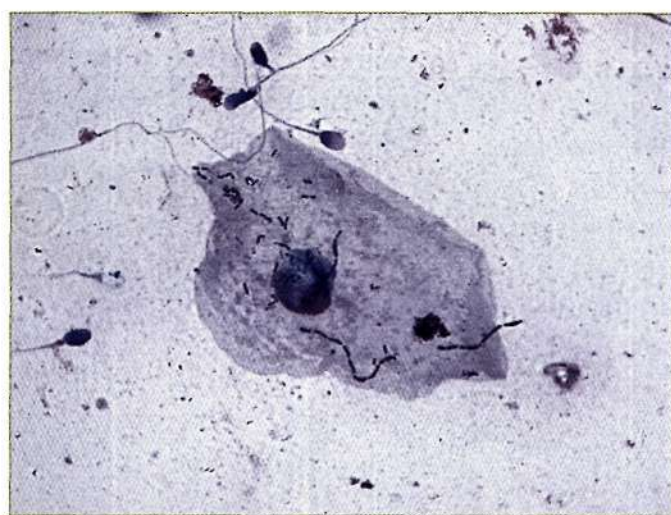


Рис. 154. Клетки поверхностного слоя ороговевающего плоского эпителия, покрытого цепочками и разрозненно лежащими бактериями в виде мелких палочек, на фоне нормальных и патологических сперматозоидов. Препарат спермы, окрашенный азур-эозином. $\times 1000$

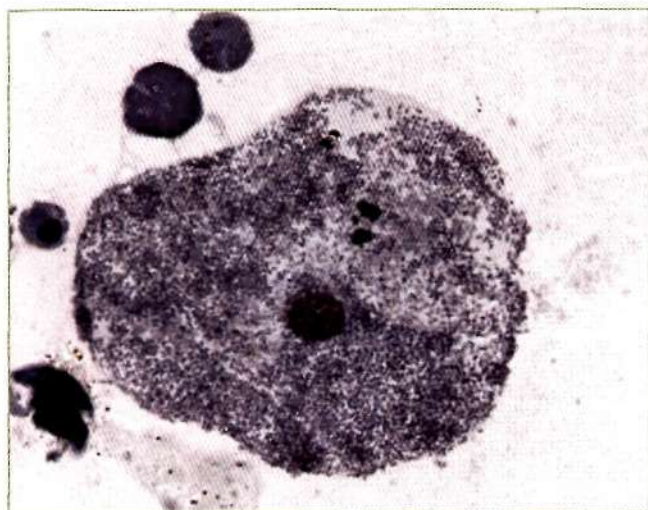


Рис. 155. Многослойный плоский ороговевающий эпителий. $\times 1000$

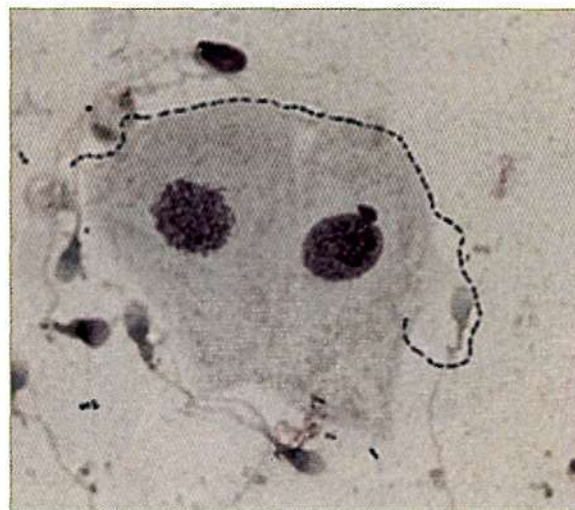


Рис. 156. Две клетки поверхностного слоя плоского эпителия. $\times 1000$

довольно длинные иглы. Они хорошо видны в нативном препарате на фоне мелкозернистых масс тканевого и кровяного распада и сохраняют свой цвет и форму в препаратах, окрашенных азур-эозином. Гематоидин не содержит железа, растворяется в щелочах и обесцвечивается перекисью водорода. Он обнаруживается в эякуляте при вскрытии старых гематом, при абсцессе и раке органов мочеполового тракта (рис. 152).

Эпителиальные клетки

Клетки многослойного плоского ороговевающего эпителия. В сперме здорового мужчины можно обнаружить единичные клетки ороговевающего поверхностного слоя многослойного эпителия, которые при эякуляции смываются с головки полового члена и крайней плоти. В нативном препарате это бесцветные, крупные, полигональной или округлой формы клетки с маленькими круг-

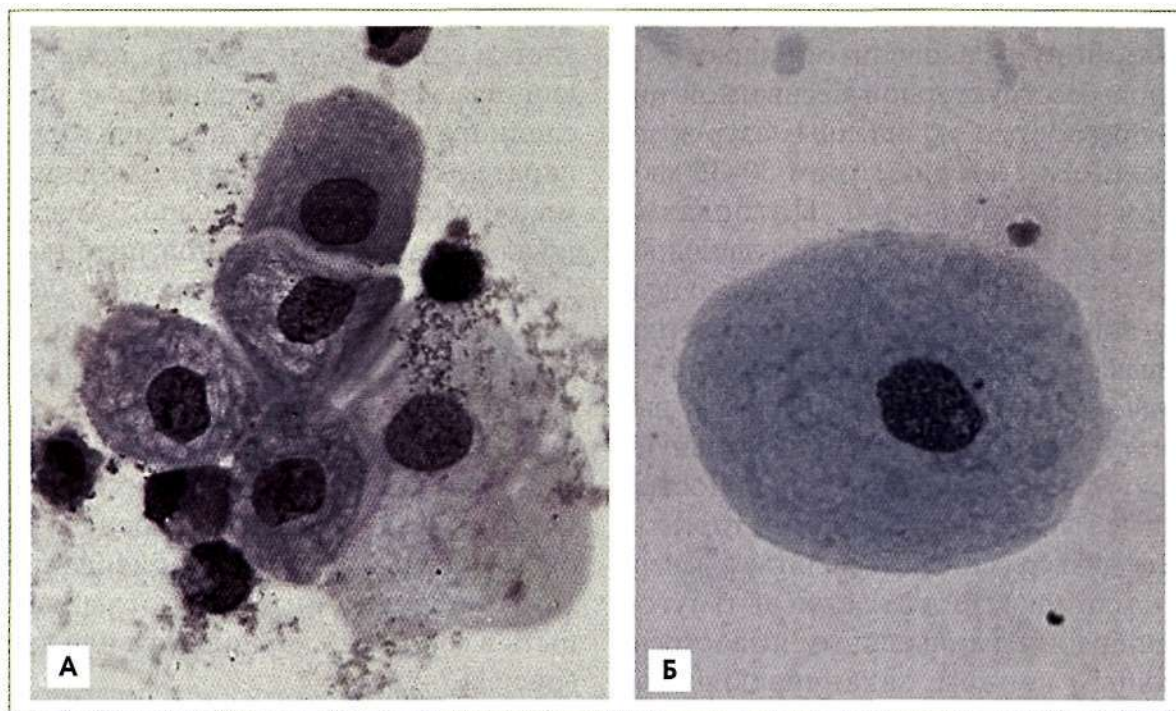


Рис. 157. Клетки переходного эпителия в эякуляте, по-видимому, из крупных простатических ходов или из простатической части уретры. Эякулят больного хроническим простатитом. Препарат окрашен азур-эозином. $\times 1000$



Рис. 158. Переходный эпителий (1), сперматиды (2), остаточное тельце (3)

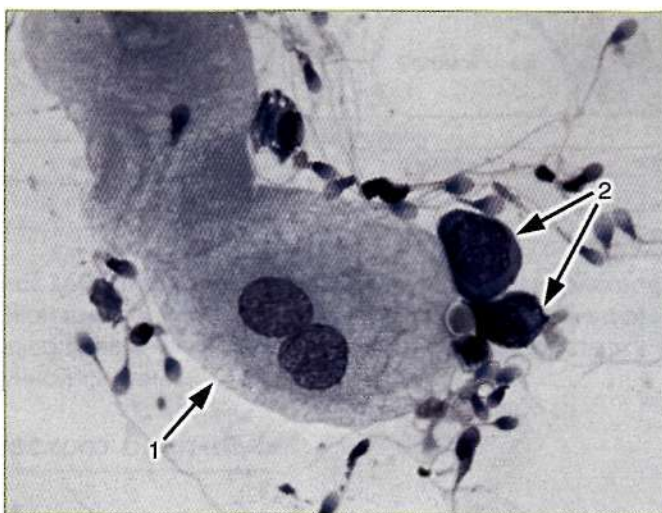


Рис. 159. Двухъядерная клетка переходного эпителия (1), клетки сперматогенеза (2)

лыми в виде пузырька ядрами (рис. 153). В препаратах, окрашенных азур-эозином, клетки поверхностного слоя крупные, диаметром 35–55 мкм, полигональной формы, с пикнотичным, гиперхромным ядром диаметром 4–6 мкм. Цитоплазма этих клеток окрашена слабо, серовато-голубого или серого цвета (рис. 154–156).

Поверхностные клетки неороговевающего многослойного плоского эпителия, выстилающие дистальный отдел ладьевидной ямки, также могут присоединиться к эякуляту. В нативном препарате спермы это крупные клетки округлой формы с маленькими пузырьковидными ядрами на фоне обильной бесструктурной бесцветной цитоплазмы. В препаратах, окрашенных азур-эозином, это крупные клетки диаметром 30–35 мкм овальной или круглой формы. Цитоплазма обильная, окрашивается в светло-базофильные тона. Ядро диаметром 8–9 мкм расположено центрально, круглой или овальной формы с частично сохранившейся хроматиновой структурой.

Цилиндрический многослойный эпителий выстилает губчатую, перепончатую и дистальную, простатическую часть уретры. Поверхностно расположенные клетки также могут отторгаться во время семяизвержения и выявляться в сперме. В нативном препарате это клетки вытянутой формы с расширенным апикальным и заостренным дистальным концом, заканчивающимся

«хвостиком» (хвостатые клетки). Они обычно находятся в состоянии дегенерации ядра и цитоплазмы. Дегенерация ядер в нативных препаратах не видна, а цитоплазмы – может быть вакуольной (округлые пустоты в цитоплазме), грубозернистой белковой или жировой (капли жира в цитоплазме).

Переходный (многослойный) эпителий. Начальные участки простатической части уретры, дистальные участки семяизвергающих каналов и простатических ходов выстланы многослойным переходным эпителием, поверхностные клетки которого также могут попасть в извергающийся эякулят. Поверхностные клетки многослойного переходного эпителия в нативном препарате округлой и неправильной округлой формы («помятые»). На большом увеличении микроскопа на фоне обильной цитоплазмы видны 1, 2 или 3 ядра. Цитоплазма этих клеток обычно находится в состоянии дегенерации (грубозернистой белковой, вакуольной или жировой). В препарате, окрашенном азур-эозином, это клетки округлой или полигональной формы, содержащие 1–3 и более ядер, занимающих меньшую часть клеток. Цитоплазма окрашена в насыщенно базофильные или светлбазофильные тона. Ядра гиперхромные, грубоглыбчатые, могут быть в состоянии кариолизиса или кариорексиса (рис. 157–159).

Иммунологическое исследование спермы

По разным оценкам от 10 до 20 процентов случаев бесплодия связано с иммунологическими факторами. Первое сообщение об антигенных свойствах сперматозоидов появилось в начале XX века (институт Пастера). Metalnikoff

обнаружил антигенные свойства спермы при введении ее в гомологичные ткани. В 1954 г. было сообщено (Rumke Wilson) о двух случаях мужского бесплодия в присутствии антиспермальных антител (АСАТ).

Защитные механизмы от иммунологической агрессии

Мужские половые железы – гонады – являются иммунопrivилегированным органом. Как и другие органы (щитовидная железа, головной мозг), герминативный эпителий половых желез развивается и отделяется в процессе эмбрионального развития раньше, чем формируется иммунная система, поэтому его антигены являются чужеродными для собственной иммунной системы (так называемые скрытые антигены). Для изоляции скрытых антигенов половых желез служит гематотестикулярный барьер (ГТБ). Основу этого барьера составляют «плотные контакты» клеток Сертоли (рис. 160).

Кроме того, клетки Сертоли секретируют FasL- на Fas-несущие лимфоциты, что вызывает апоптоз последних (FAS – рецепторы активационного апоптоза лимфоцитов).

После выхода сперматозоидов из яичка действует другой механизм их защиты – способность мимикрировать (приспосабливаться) к окружающей среде, в частности сбрасывать с оболочки ранее сорбированные антигены и адсорбировать новые из других сред, в том числе и из женского репродуктивного тракта. Эта способность сильнее выражена у жизнеспособных спермиев. Кроме того, в спермоплазме содержатся местные регуляторные факторы, препятствующие образованию антиспермальных антител и развитию клеточной антиспермальной сенсibilизации (например, иммуносупрессивный фактор спермоплазмы). Эти факторы секретируются в придаточных железах мужской репродуктивной системы.

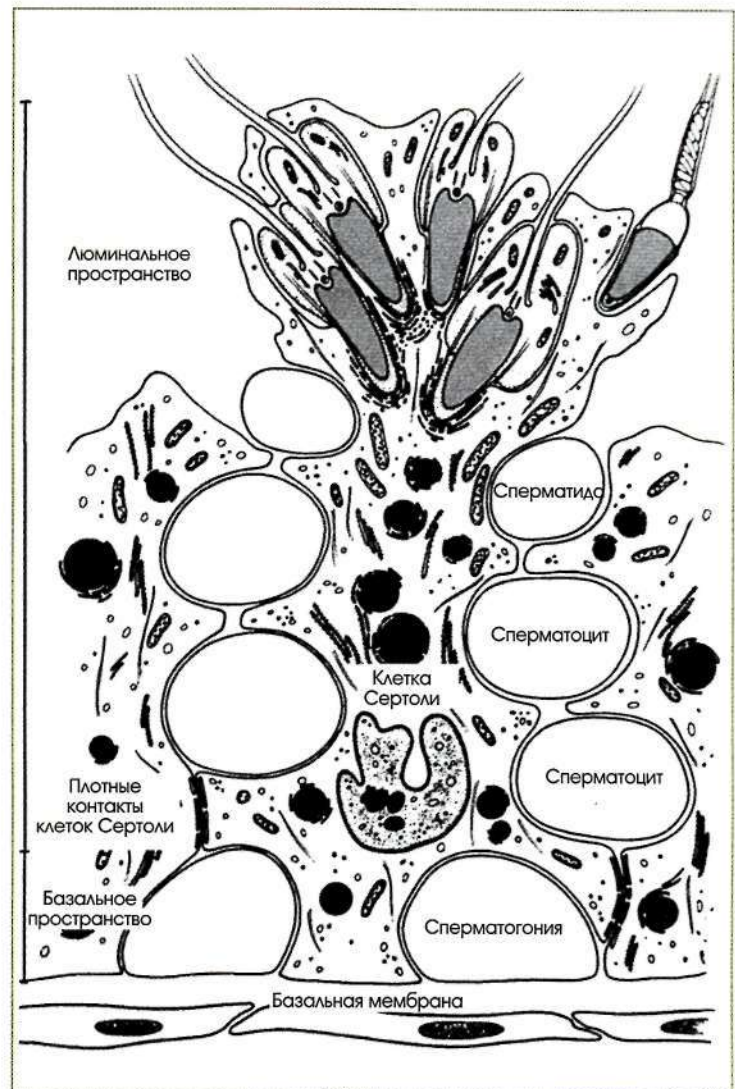


Рис. 160. Плотные контакты клеток Сертоли являются основой гематотестикулярного барьера и обеспечивают изоляцию герминативного эпителия от взаимодействия с иммунной системой

Патогенез иммунологического бесплодия

В патогенезе развития иммунологического бесплодия основное место занимает действие аутоантител к собственным сперматозоидам.

Сбой механизмов защиты на любом уровне может способствовать появлению антиспермальных антител.

Повреждение ГТБ открывает для иммунной системы доступ к ткани яичка, являющейся носителем антигенов, к которым в организме не выработана иммунологическая толерантность. Чаще всего барьер повреждается в области сплетения и семявыносящих канальцев. На экспериментальных моделях показано, что лимфоциты вызывают первичное повреждение, способствующее проникновению цитотоксических антител и комплемента к сперматоцитам. Деструкция в системе семявыносящих протоков ведет к вторичным иммунным поражениям в пределах семенных канальцев, вовлекающим клеточноспецифические антигены на всех стадиях сперматогенеза, и появлению антиспермальных антител. Эта экспериментальная модель имеет свои аналоги в клинике. Хирургические вмешательства, травмы мошонки, воспалительные заболевания мужской репродуктивной системы различной этиологии часто приводят к на-

рушению целостности ГТБ и развитию аутоиммунитета к антигенам сперматозоидов.

Недостаточность механизма мимикрии приводит к контакту спермальных антигенов с иммунной системой и выработке антиспермальных антител как в мужском, так и в женском организме. Нарушения процессов сперматогенеза (в яичках) или функционального созревания спермиев (в эпидидимисе), вызванные различными причинами (воспалительные заболевания, варикоцеле, крипторхизм, эндокринная патология), приводят к снижению жизнеспособности сперматозоидов и нарушению механизма мимикрии. Антиспермальные антитела в процессе сперматогенеза появляются на стадии сперматоцитов I порядка, причем уровень их экспрессии увеличивается по мере развития сперматозоидов, они обладают свойством аутоантигенности, т. е. иммунологически чужеродны в собственном организме.

Антиспермальные антитела (АСАТ)

Из всех антител клиническое значение имеют иммуноглобулины А и G. IgA синтезируются местно в репродуктивном тракте и практически отсутствуют в сыворотке крови, где их определение считается нецелесообразным. Эти иммуноглобулины возникают практически сразу после нарушения ГТБ и исчезают примерно через две недели после его восстановления. IgG имеют системное происхождение и проникают в репродуктивный тракт из циркулирующей крови. Они возникают примерно через две недели после нарушения ГТБ и определяются достаточно долгое время – от 6 месяцев до года после восстановления ГТБ. Исходя из этого, определение IgA имеет клиническое значение для установления факта нарушения ГТБ и мониторинга состояния, вызвавшего это нарушение. Определение IgG более оправданно для диагностики иммунного бесплодия, т. е. более часто применимо при лабораторном обследовании пациента.

По реактивности АСАТ подразделяют на агглютинирующие, иммобилизирующие и цитотоксические. Эти реакции осуществляют антитела и поверхностные антигены, принадлежащие собственно сперматозоидам или покрывающие их. IgG чаще участвуют в иммобилизирующих и спермцитотоксических реакциях, для реализации

которых необходим комплемент. Иммуноглобулины класса А чаще обладают агглютинирующими свойствами и являются более значимыми для развития иммунологического бесплодия. Помимо повреждения сперматозоидов, АСАТ оказывают неблагоприятное воздействие на сперматогенный эпителий (снижение объема эпителия канальцев, межклеточный отек).

Антигены, вызывающие образование агглютинирующих антител, могут присутствовать на головке (акросомальная область, экваториальная область, постнуклеолярный колпачок), шейке и хвосте сперматозоидов. Повышенные титры АСАТ часто выявляются при варикоцеле, крипторхизме, обструкции семявыносящих протоков, инфекции (орхит, простатит), а также при механическом повреждении яичек (травма, перекрут, проведенная биопсия).

АСАТ в крови выявляются у здоровых мужчин (1–10%) и у мужчин с бесплодием (15–22%). В высоком титре АСАТ встречаются всего у 6–7% мужчин и до 25% – у бесплодных женщин. Мнение о связи АСАТ с нарушением фертильности базируется в основном на статистических данных. Их частота выше среди бесплодных популяций, чем у здоровых фертильных людей. Однако АСАТ в крови могут встречаться и у мужчин с

подтвержденной фертильностью, поэтому до сих пор неясно, какое количество АСАТ является нормальным, а какое – патологическим, приводящим к нарушению репродуктивной функции. Наибольшее число исследователей склоняются к тому, что АСАТ в сперме и на изолированных сперматоцитах коррелируют со снижением фертильности, тогда как между АСАТ в крови и фертильностью такой связи не прослеживается.

Антиспермальные антитела у женщин

Половые органы женщины содержат большое количество иммунокомпетентных клеток. Естественное попадание спермы в половые пути женщины может вызвать иммунный ответ. Однако иммунологические процессы, происходящие в женском организме после попадания спермы, недостаточно изучены.

Образованию антител в женском организме препятствуют различные механизмы, снижающие иммунный ответ. В период овуляции изменяется баланс Т-лимфоцитов: уровень Т-хелперов снижается, Т-супрессоров – повышается, уменьшается концентрация иммуноглобулинов и С3-компонента системы комплемента. Важную роль в снижении иммунного ответа на сперматозоиды играют мужские механизмы защиты: мимикрия – сорбция и десорбция поверхностных антигенов при смене сред и иммуносупрессивный фактор спермоплазмы. Нарушение фертильности сопровождается нарушением защитных механизмов и появлением антиспермальных антител. Выработку антиспермальных антител в женском организме стимулирует дополнительное воздействие других изоантигенов, получающих доступ в половые пути женщины. Так, иммунный ответ на антигены сперматозоидов может повышаться при воспалительных заболеваниях влагалища. Изоиммунный ответ на сперматозоиды может реализовываться через антитела или клеточно-опосредованные механизмы, каждый из которых оказывает чаще всего местный эффект. Шейка матки является наиболее благоприятным и важным местом проявления местного иммунитета. Часто антиспермальные антитела обнаруживаются только в цервикальной жидкости и не определяются в сыворотке крови.

Антиспермальные антитела классов IgG и IgA цервикальной слизи и других жидкостей женского репродуктивного тракта препятствуют продвижению сперматозоидов и их пенетрации через цервикальную слизь, блокируют рецепторные участки на головке сперматозоида, ответственные за связывание с блестящей оболочкой яйцеклетки. Кроме того, антиспермальные антитела нарушают процесс капацитации сперматозоидов, воздействуют на акросомальную реакцию, блокируя экзоцитоз кортикальных гранул.

Однако необходимо помнить, что гиперчувствительность замедленного типа к сперме и спермиммобилизирующие антитела могут встречаться и у здоровых женщин, имеющих регулярные половые сношения.

Возможные механизмы повреждающего действия антиспермальных антител на фертильность

В литературе нет однозначного мнения о влиянии антиспермальных антител на качество эякулята. По мнению одних авторов, наличие антиспермальных антител не влияет на подвижность и другие морфологические характеристики сперматозоидов. Другие считают, что антиспермальные антитела вызывают снижение скорости движения и жизнеспособности спермиев за счет образования агрегатов (рис. 161). Предполагается, что антиспермальные антитела могут нарушать

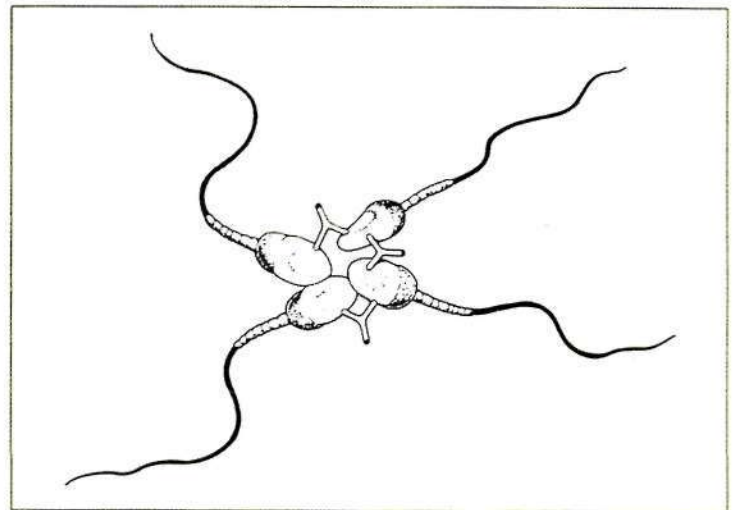


Рис. 161. Агглютинация сперматозоидов при адгезии на них антиспермальных антител. Такие сперматозоиды не способны двигаться, в результате снижается оплодотворяющая способность эякулята

функциональную целостность мембраны сперматозоидов. У мужчин с антиспермальными антителами часто наблюдается снижение показателей теста гипоосмотического набухания сперматозоидов, что сочетается с ослаблением оплодотворяющей способности эякулята. Антиспермальные антитела могут оказывать повреждающее действие на функцию предстательной железы, в частности на простасомы – органеллы ацинарных клеток предстательной железы.

Возможно неспецифическое воздействие АСАТ на ткани, близкие по антигенной структуре: гладкая мускулатура, надпочечники, яичники, щитовидная железа, нервная ткань. Описываются также аллергические реакции, вплоть до анафилактического шока.

Выявление антител к сперматозоидам

Определение антиспермальных антител в настоящее время становится одним из самых востребованных тестов при диагностике бесплодия. В диагностических целях проводится:

- Качественное определение АСАТ.
- Количественное определение АСАТ.
- Определение специфических комплексов антиген–антитело.

Качественное определение АСАТ

Агглютинирующие тесты (Kibrick, 1952; Franklin & Dukes, 1964; Friberg, 1974): инкубация семенной плазмы пациента с отмытыми донорскими сперматозоидами. Недостаток – неспецифическая агглютинация в присутствии бактерий, плазменных факторов. Кроме того, тест позволяет оценить присутствие только агглютинирующих антител.

Тем не менее тест прост в постановке и не требует специальных реагентов. Ниже приводится одна из модификаций агглютинирующего теста (тест Фриберга).

Тест Фриберга

Принцип. При наличии антител к сперматозоидам в исследуемом материале (семенная плазма, цервикальная слизь, сыворотка крови) происходит агглютинация донорских сперматозоидов посредством этих антител.

Материал исследования. Для исследования берутся: семенная плазма (центрифугирование

1500 g 10–15 мин); сыворотка крови (центрифугирование 1500 g 10–15 мин, затем инактивация сыворотки при 56 °С 30 мин); цервикальная слизь без предварительной обработки; сперма донора (с заведомо известным отрицательным результатом на антиспермальные антитела и концентрацией сперматозоидов не ниже 40 млн/мл), желативно собранная непосредственно перед исследованием (или размороженная).

Расходный материал и приборы. Из приборов и материалов понадобятся микроскоп, иммунологический планшет (с лунками U-типа) или микропробирки, автоматические дозаторы (на 0,04 мл и 0,1–0,3 мл) одноразовыми наконечниками.

В эякуляте донора подсчитывают концентрацию сперматозоидов. При необходимости эякулят разводят фосфатно-солевым буфером, чтобы получить концентрацию 40 млн/мл.

Фосфатно-солевой нейтральный буфер (рН 7,2–7,4) можно приготовить из концентрата (обязателен контроль рН) или из навесок исходных солей.

Рецепт приготовления буфера:

1. Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4) – 0,4 г.
2. Натрий фосфорнокислый двузамещенный (Na_2HPO_4) – 2,17 г.
3. Натрий хлористый (NaCl) – 8,5 г.

Навески солей растворить в 700–800 мл бидистиллированной воды, довести до 1 литра в мерной колбе, проконтролировать рН (7,2–7,4).

Проведение реакции. В лунках планшета (или пробирках) проводят серию разведений исследуемого материала пациента (7 разведений) от 1:4 до 1:256. Для этого в первую лунку приливают 0,3 мл буфера, в остальные шесть – по 0,2 мл. В первую лунку добавляют 0,1 мл исследуемого материала, перемешивают. Затем из нее переносят 0,2 мл смеси во вторую лунку, перемешивают, из нее – 0,2 мл в третью, перемешивают и т. д. до седьмой лунки (1:256). Из седьмой лунки после перемешивания 0,2 мл смеси просто удаляют. Для каждого исследуемого образца необходимо использовать новый наконечник. К каждой лунке добавляют 0,04 мл донорских сперматозоидов и хорошо перемешивают. Планшет или пробирку следует закрыть крышками и инкубировать при 18–20 °С в течение 4 часов. После окончания инкубации из каждой лунки, предварительно перемешав, берут по одной капле и наносят на пред-

метное стекло. Препарат исследуют под покровным стеклом в световом или фазово-контрастном микроскопе при малом и большом увеличении ($\times 400$, $\times 600$), подсчитывая количество агглютинатов в поле зрения (рис. 162). Последнее разведение, где наблюдается 3 или более агглютинатов в поле зрения, принимается за титр агглютинирующих антител. Наличие агглютинации в титре 1:4 и 1:8 может рассматриваться как неспецифическая реакция. Начиная с титра 1:16 и выше агглютинация доказывает наличие специфических антител и может свидетельствовать об иммунном механизме бесплодия.

Смешанная реакция агглютинации (MAR – Mixed Antiglobulin Reaction; Jager, 1978)

MAR-тест с антителами класса IgA и IgG проводят путем смешивания образца нативного эякулята с частичками латекса или эритроцитами, по-

крытыми человеческими антителами класса IgA или IgG (рис. 163). К этой смеси добавляют моноспецифическую IgG-антисыворотку. Образование смешанных агглютинатов между частичками и подвижными сперматозоидами показывает, что последние покрыты антителами класса IgA или IgG. Постановка диагноза иммунологического бесплодия правомочна, если частички прикреплены к не менее чем 50% подвижных сперматозоидов. Однако этот диагноз должен быть подтвержден тестами на взаимодействие сперматозоидов с цервикальной слизью.

В модификации теста (Bronson, 1984) вместо эритроцитов используются частицы латекса.

Тест с латексными частицами

Частицы латекса представляют собой полиакриламидные сферы, ковалентно связанные с

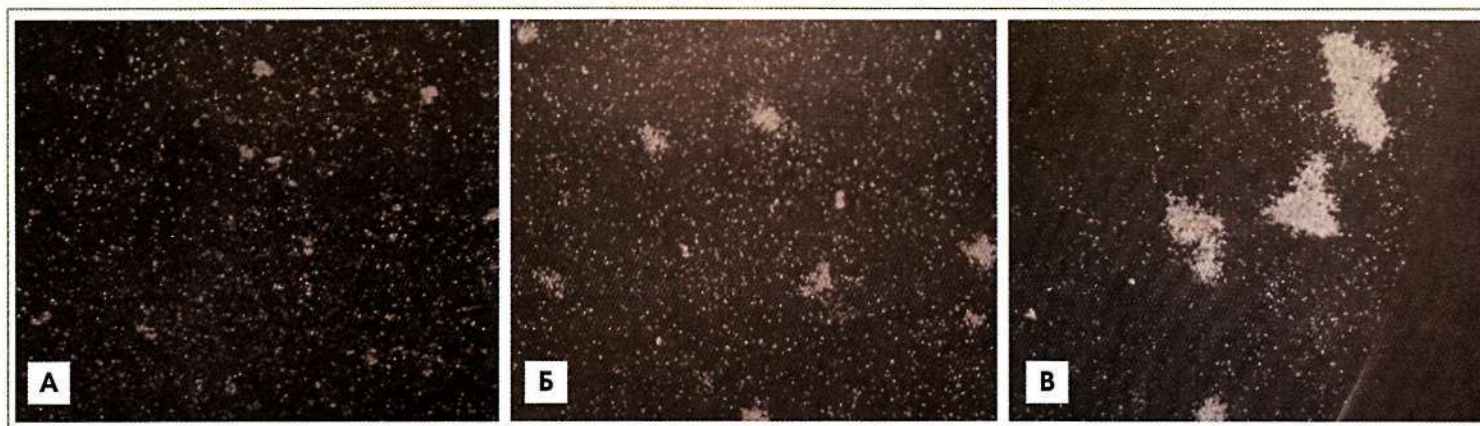


Рис. 162. Агглютинация сперматозоидов, вызванная антиспермальными антителами: А – реакция неспецифическая (агглютинация отсутствует), Б – слабовыраженная агглютинация, В – выраженная агглютинация, свидетельствующая о наличии АСАТ в сыворотке

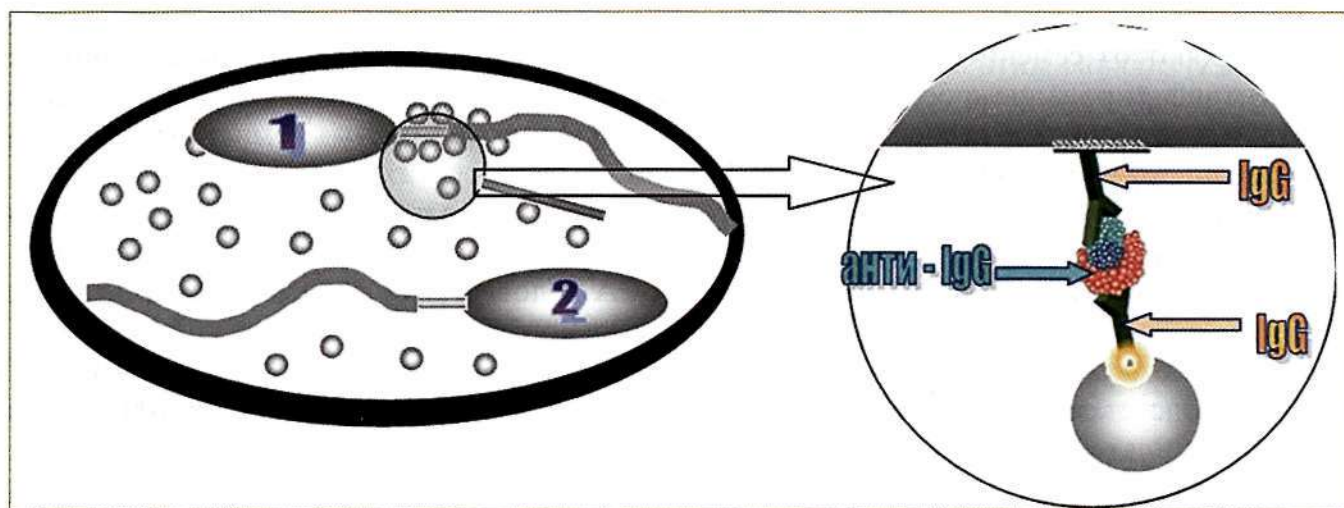


Рис. 163. Схема MAR-теста IgG (сперматозоид 1 покрыт АСАТ, сперматозоид 2 – нормальный)

кроличьими иммуноглобулинами против глобулинов человека. При помощи этого теста одновременно можно определять наличие антител класса IgA и IgG.

Процедура анализа

Модификация на нативном эякуляте. На предметное стекло наносят 10 мкл неотмытого эякулята, 10 мкл латексных частичек, покрытых IgG или IgA (коммерческого производства), и 10 мкл антисыворотки к IgG или IgA человека.

Сначала перемешивают капли эякулята и латексных частичек, покрытых IgG (или IgA), затем добавляют к ним каплю антисыворотки. Накрывают смесь покровным стеклом большего размера. Через 2–3 мин и еще раз через 10 мин исследуют препарат в фазово-контрастном либо в световом микроскопах при увеличении $\times 400$ или $\times 600$.

Интерпретация

Если сперматозоиды не покрыты антителами, то при исследовании видно, что они свободно двигаются между частичками, которые склеиваются между собой и образуют группы (это подтверждает, что препарат приготовлен правильно).

Если же сперматозоиды покрыты антителами, то к подвижным сперматозоидам прикрепляются частички латекса. Постепенно агглютинаты становятся настолько массивными, что подвижность сперматозоидов резко ограничивается.

Следует подсчитать, по крайней мере, 200 сперматозоидов и выявить процент подвижных, к которым прикреплены латексные частички.

Модификация на отмытом эякуляте. Сперматозоиды отделяют от семенной жидкости двукратным центрифугированием, осадок смешивают с буфером для получения суспензии. Суспензию сперматозоидов смешивают с суспензией латексных частиц. Полученный препарат исследуют под фазово-контрастным микроскопом при увеличении $\times 400$. Латексные частицы склеиваются с подвижными сперматозоидами, на поверхности которых имеются антитела.

Проводят подсчет сперматозоидов (в процентах), связанных с латексом, отмечают характер связывания. Класс антител можно установить, применяя различные сорбированные на латексе иммуноглобулины. Считается, что не менее 50%

подвижных сперматозоидов должны быть покрыты антителами, чтобы существенно нарушились пенетрация сперматозоидами цервикальной слизи и оплодотворение *in vivo*. На основании этого, как минимум, 50% подвижных сперматозоидов должны быть связаны с латексными частицами, чтобы считать тест клинически значимым. Связывание латексных частиц с кончиками хвостов сперматозоидов не обязательно ассоциируется с нарушением фертильности и может встречаться у здоровых мужчин.

Тест с иммунными шариками

Реагенты

Коммерческие иммунные шарики анти-IgG, -IgA и -IgM могут идентифицировать все изоотипы иммуноглобулинов. Шарики разводят согласно инструкции производителя. Эту смесь с добавлением консерванта можно хранить в течение нескольких месяцев при температуре 4 °С.

Таблица 11

Состав растворов для приготовления основных буферов

Раствор Тироде, г/л		ФБС Дульбекко, г/л	
CaCl ₂	0,2	CaCl ₂	0,1
KCl	0,2	KCl	0,2
NaH ₂ PO ₄	0,05	KH ₂ PO ₄	0,2
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,2	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,1
NaCl	8,0	NaCl	8,0
NaHCO ₃	1,0	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	2,16
Глюкоза	1,0		

Основной буфер: можно использовать раствор Тироде (Tyrode) или фосфатно-буферную среду (ФБС) Дульбекко (Dulbecco). Оба раствора можно приобрести в разных компаниях или составить по прописи.

Буфер I: содержит 0,3% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА). Отвесить 0,3 г БСА и довести до объема 100 мл добавлением основного буфера.

Буфер II: содержит 5% раствор БСА. Отвесить 5 г БСА и довести объем до 100 мл добавлением основного буфера.

Перед использованием все растворы следует отфильтровать через микрофильтры 0,22 или 0,45 мкм и подогреть до температуры 25–35 °С.

Порядок исследования

В отдельные конические центрифужные пробирки налить по 0,2 мл основной суспензии каждого класса иммунных шариков и 10 мл буфера I.

Налить в конические центрифужные пробирки требуемое количество эякулята и довести объем до 10 мл буфером I. Количество эякулята определяют в зависимости от концентрации и подвижности сперматозоидов на основании табл. 12.

Таблица 12

Расчет количества эякулята

Концентрация, 10^6 /мл	Подвижность* (категории А + В), %	Количество эякулята, мл
>50		0,2
20–50	>40	0,4
20–50	<40	0,8
<20	>40	1,0
<20	<40	2,0

* См. раздел «Кинезиограмма».

Все пробирки отцентрифугировать при 500 g в течение 5–10 мин.

Из пробирок со сперматозоидами слить супернатант, осторожно развести осадок сперматозоидов в 10 мл свежего буфера I и снова отцентрифугировать при 500 g в течение 5–10 мин. Отделить и слить супернатант. Осторожно развести осадок сперматозоидов в 0,2 мл буфера II.

Из пробирок с иммунными шариками отделить и слить супернатант. Осторожно развести суспензию с латексными частицами в 0,2 мл буфера II. Нанести капли (5 мкл) шариков каждого класса на одно или несколько предметных стекол. К каждой капле добавить по 5 мкл отмытой суспензии сперматозоидов и тщательно перемешать, используя либо кончик пипетки, либо край покровного стекла. Каждую каплю смеси накрыть покровным стеклом, поместить препарат на 10 мин во влажную камеру и исследовать под фазово-контрастным микроскопом при увеличении $\times 400$, $\times 600$.

Подсчитать отдельно процентное содержание подвижных сперматозоидов, к которым прикрепились два и более иммунных шарика (не учитывать прикрепление к кончику хвоста сперматозоида). Дважды подсчитать, по крайней мере, по 200 подвижных сперматозоидов в каждом препарате. Отметить класс (IgA или IgG) и мес-

то прикрепления иммунных шариков к сперматозоиду (головка, средняя часть, хвост).

Интерпретация. Тест считается положительным и клинически значимым, если 50% и более подвижных сперматозоидов покрыты иммунными шариками. Прикрепление иммунных шариков к кончику хвоста сперматозоида не считается клинически значимым.

Непрямой тест с иммунными шариками (антиспермальные антитела)

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

Дважды отмыть образец сперматозоидов донора буфером I, как описано выше.

Довести отмытую суспензию сперматозоидов до концентрации 50×10^6 /мл буфером II.

Развести 10 мкл тестируемой жидкости в 40 мкл буфера II, добавить 50 мкл отмытой суспензии сперматозоидов и все тщательно смешать. Инкубировать смесь в течение 1 ч при 37°C .

Дважды отмыть сперматозоиды и провести тест с иммунными шариками, как описано выше.

Для каждой партии тестов следует проводить положительный и отрицательный контроль. Положительный контроль проводят с использованием сыворотки донора с высокими титрами антиспермальных антител (в сыворотке) по результатам непрямого теста с иммунными шариками.

Эту сыворотку подвергают анализу параллельно с каждой партией исследуемых образцов.

Количественные методики

- Иммуноферментный анализ (Zanchetta, 1982; Alexander & Bearwood, 1983).
- Радиоиммунный анализ (Haas, 1980).
- Проточная цитометрия (Haas & Cunningham, 1984).

Критерий. Положительным считается результат обнаружения АСАТ в крови более 75 МЕ/мл.

Определение специфических антиген-антительных связей

- Иммуноблоттинг (Hayes, 1989; Snow & Ball, 1992).
- Хроматография с иммуноабсорбцией (Roitt, 1997).

Исследование взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью

Эпителий слизистой шейки матки состоит из секреторных клеток различного типа. Природа и количество секреторных клеток варьируют в различных участках шейки матки. Продукты секреции этих клеток входят в состав цервикальной слизи. Гормоны яичника регулируют секрецию цервикальной слизи. Изменение объема секреции цервикальной слизи носит циклический характер. У здоровых женщин репродуктивного возраста суточная продукция слизи колеблется от 0,5 мл в середине менструального цикла до менее 0,1 мл в другие фазы цикла. В состав цервикальной слизи входит небольшое количество эндометриальной, трубной и, возможно, фолликулярной жидкости. Кроме того, в цервикальной слизи присутствуют лейкоциты и клеточный детрит из эпителия слизистой матки и цервикального канала. Цервикальная слизь – это гетерогенный секрет, состоящий из компонентов «высокой» и «низкой» вязкости. Она характеризуется консистенцией, растяжимостью и кристаллизацией. Компонент «высокой» вязкости состоит из муцина – волокнистой системы, построенной из пептидного ядра и олигосахаридных боковых цепей. К компоненту низкой вязкости относятся электролиты, органические соединения и растворимые белки. Циклические изменения составных частей цервикальной слизи могут влиять на проникающую способность и выживаемость сперматозоидов. Сперматозоиды способны пенетрировать цервикальную слизь приблизительно с 9-го дня нормального 28-дневного менструального цикла, и эта способность постепенно усиливается, достигая своего пика непосредственно перед овуляцией. После этого способность к пенетрации снижается, причем раньше, чем наступают видимые изменения в харак-

тере цервикальной слизи. Часто отмечается индивидуальная вариабельность во времени и степени проницаемости слизи для сперматозоидов. Подвижные сперматозоиды, направляемые волокнами цервикальной слизи, попадают в цервикальные крипты, где они могут собираться, а затем постепенно проникать в матку и маточные трубы.

Шейка матки и ее секрет восприимчивы к пенетрации сперматозоидами во время или перед овуляцией и создают барьер для пенетрации в другие фазы цикла, защищают сперматозоиды от «враждебной» среды влагалища и от фагоцитоза. В слизи шейки матки происходит селекция сперматозоидов за счет разницы в подвижности и морфологии, а также инициация капацитации сперматозоидов.

Сперматозоиды в цервикальной слизи всегда находятся в жидкой среде в виде суспензии. Взаимодействие сперматозоидов с секретами репродуктивного тракта женщины критически важно для выживания и сохранения функциональной способности сперматозоидов. В настоящее время отсутствуют методы, с помощью которых можно было бы на практике оценить влияние маточной и трубной жидкости на сперматозоиды. Цервикальная же слизь легко доступна для взятия образца и исследования. Оценка взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью очень важна, ее следует включать в обследование по поводу бесплодия. Выявление нарушения взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью может служить показанием к проведению искусственной внутриматочной инсеминации или других методов вспомогательных репродуктивных технологий.

Получение и оценка образцов цервикальной слизи

Процедура получения

Шейку матки обнажают в зеркалах и осторожно протирают тампоном для удаления выделений из влагалища. Слизь из наружного зева извлекают при помощи тампона или пинцета. Слизь из цервикального канала можно получить методом

аспирации при помощи туберкулинового шприца (без иглы), шприца для слизи, пипетки или полиэтиленовой трубочки. Если это возможно, оценку качества слизи следует проводить сразу же после взятия. Если это невозможно, слизь следует консервировать до проведения анализа.

При получении слизи методом аспирации важно, чтобы сила давления на поршень инструмента (шприц, катетер и т. д.) была стандартной. Аспирацию начинают после того, как кончик инструмента введен приблизительно на 1 см в цервикальный канал. Выводят инструмент постепенно, продолжая аспирацию. Давление на поршень прекращают непосредственно перед выведением инструмента из наружного зева.

Хранение и консервация

Образцы слизи можно хранить в туберкулиновом шприце, полиэтиленовых пробирках или в маленьких закрытых аналитических пробирках. Следует следить за тем, чтобы в контейнерах было минимальное количество воздуха. Образцы следует хранить в холодильнике при температуре 4 °С не более 5 дней. Образцы слизи желательно исследовать в течение двух дней после получения, а интервал между получением и исследованием нужно всегда отмечать. Образцы слизи нельзя замораживать.

Оценка свойств цервикальной слизи

Оценка свойств цервикальной слизи проводится в баллах (по 3-балльной системе) на основе ее объема, консистенции, кристаллизации, растяжимости и клеточного состава. Максимальная сумма – 15 баллов. Оценка выше 10 баллов обычно говорит о хорошем качестве цервикальной слизи, благоприятствующей проницаемости сперматозоидами, а ниже 10 – о плохом качестве слизи. Данные о рН слизи не включаются в общую оценку, однако этот параметр следует измерять, так как он является важным фактором взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью.

Объем расценивается в баллах следующим образом: 0 – 0 мл; 1 – 0,1 мл; 2 – 0,2 мл; 3 – 0,3 мл и более.

Консистенция цервикальной слизи является самым важным из факторов, влияющих на пенетрацию сперматозоидов. В середине менструального цикла миграция сперматозоидов сквозь цервикальную слизь осуществляется без особого препятствия. «Вязкая» же слизь в лютеиновую фазу создает серьезный барьер. Клеточный детрит и лейкоциты в цервикальной слизи также затруд-

няют миграцию сперматозоидов. Показано, что выраженный эндоцервицит ассоциируется со сниженной фертильностью. Консистенция оценивается в баллах следующим образом: 0 – густая, очень «вязкая», предменструальная слизь; 1 – менее «вязкая» слизь; 2 – умеренно «вязкая» слизь; 3 – жидкая, минимально «вязкая» слизь середины цикла (преовуляторная).

Кристаллизация «симптом папоротника» (рис. 164) оценивается при исследовании под микроскопом мазка цервикальной слизи, высушенного на воздухе. При этом в препарате видны различные узоры кристаллов, которые похожи на листья папоротника. В зависимости от структуры слизи «листья папоротника» могут иметь толь-

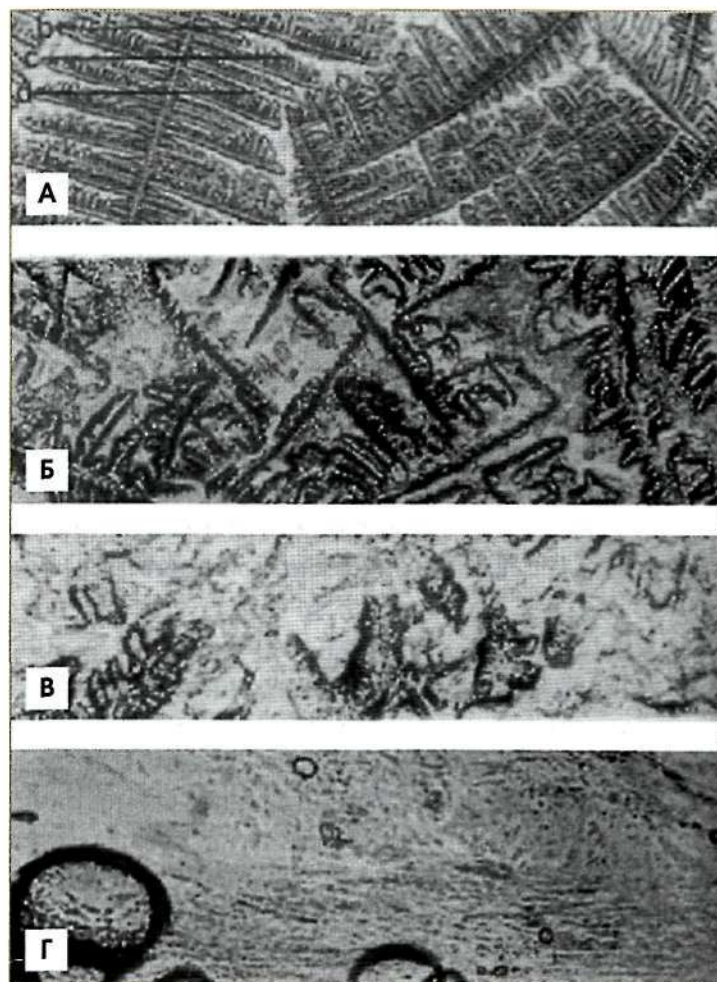


Рис. 164. Примеры «феномена папоротника», образующегося в цервикальной слизи, высушенной на воздухе: А – «папоротник» с первичным, вторичным, третичным и четвертичным «стеблем» (оценка 3 балла); Б – в основном первичные и вторичные «стебли» (оценка 2 балла); В – атипичная кристаллизация (оценка 1 балл); Г – нет кристаллизации (оценка 0 баллов), круглые образования – пузырьки воздуха

ко первичные «стебли» или разветвляться однократно, двукратно, трехкратно, образуя вторичные, третичные и четвертичные «стебли» соответственно. Просматривают несколько полей зрения, сумму баллов подсчитывают с учетом наивысшей степени образования «листьев папоротника», типичного для данного образца слизи по следующим параметрам: **0** – кристаллизации нет; **1** – формирование атипичных «стеблей папоротника»; **2** – образование первичных и вторичных «стеблей папоротника»; **3** – образование третичных и четвертичных «стеблей папоротника».

Растяжимость. Предметное стекло с цервикальной слизью накрывают покровным стеклом или другим предметным стеклом крест-накрест, затем его осторожно приподнимают. Длину цервикальной слизи между стеклами измеряют в сантиметрах и оценивают в баллах следующим образом: **0** – <1 см; **1** – 1–4 см; **2** – 5–8 см; **3** – 9 см и более.

Состав клеток цервикальной слизи. Рекомендуется выражать результаты подсчета в «клетки/мкл». Оценка содержания лейкоцитов и других типов клеток в цервикальной слизи традиционно основывается на числе клеток, подсчитанных в поле зрения при микроскопировании с высоким увеличением, при котором диаметр поля микроскопа равен приблизительно 500 мкм. Толщину препарата также можно сделать стандартной, поместив между предметным и покровным стеклом силиконовую смазку, содержащую стеклянные шарики толщиной 100 мкм. При толщине поля в 100 мкм

его объем составит 0,02 мм³. Следовательно, 10 клеток будут соответствовать приблизительно 500 клеткам/мкл. Оценка количества клеток в баллах следующая: **0** – >20 клеток в поле зрения или >1000 клеток/мкл; **1** – 11–20 клеток в поле зрения или 501–1000 клеток/мкл; **2** – 1–10 клеток в поле зрения или 1–500 клеток/мкл; **3** – 0 клеток/мкл или в поле зрения.

Реакция среды. рН цервикальной слизи определяют с помощью индикаторной бумаги *in situ* или сразу после взятия образца. Если рН измеряется *in situ*, следует проводить эту процедуру правильно, так как рН во влагалище всегда ниже, чем в эндоцервиксе, поэтому следует избегать смешивания с выделениями из влагалища, имеющими кислую рН. Сперматозоиды чувствительны к изменению рН цервикальной слизи. Кислая слизь иммобилизует сперматозоиды, в то время как щелочная может усиливать их подвижность. Однако избыточная щелочность цервикальной слизи (рН выше 8,5) может оказывать отрицательное влияние на подвижность сперматозоидов. Оптимальные величины рН для выживаемости и миграции сперматозоидов в цервикальной слизи находятся в пределах 7,0–8,5, что соответствует уровню рН нормальной цервикальной слизи в середине менструального цикла. При рН от 6 до 7 пенетрация также возможна. В некоторых случаях среда цервикальной слизи существенно меняется в сторону кислой. Это может быть следствием либо патологической секреции, либо наличия бактериальной инфекции.

Взаимодействие сперматозоидов с цервикальной слизью

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

Тест *in vivo* (посткоитальный тест)

Время проведения. Посткоитальный тест следует проводить как можно ближе к моменту овуляции, определяемой на основании клинических критериев (т. е. обычной продолжительности цикла, базальной температуры, изменений цервикальной слизи, цитологии влагалища; если возможно, определения уровня эстрогенов в слювотке или моче и УЗИ яичников). Важно, чтобы каждая лаборатория проводила исследование цервикальной слизи через стандартный промежуток времени после коитуса. Это время варьирует в пределах от 9 до 24 часов.

Рекомендуемые инструкции для пациентов по подготовке к посткоитальному тесту. Партнеры должны воздержаться от половых сношений до проведения теста в течение, как минимум, 2 дней. Наиболее подходящим днем для проведения теста является дата _____. Половое сношение должно произойти в ночь накануне этого дня.

Не следует пользоваться вагинальной смазкой во время полового сношения и подмываться после. Можно принять душ после полового сношения, но не следует принимать ванну. Следует явиться в клинику: дата _____ в _____ часов.

Техника проведения посткоитального теста. Во влагалище вводят зеркало (без смазки) и туберкулиновым шприцем (без иголки), пипеткой или полиэтиленовой трубкой берут образец выделений из заднего свода влагалища. Другим шприцем или катетером берут образец слизи из цервикального канала. Далее каждый образец наносят на отдельное предметное стекло, накрывают покровным стеклом и исследуют при стандартной глубине с помощью фазово-контрастного микроскопа.

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

Образец цервикальной слизи. Число сперматозоидов в нижней части цервикального канала варьирует к зависимости от времени, прошедшего после полового сношения. Через 2–3 часа после коитуса в нижней части цервикального канала скапливается большое число сперматозоидов. Рекомендуется, чтобы концентрация сперматозоидов в слизи выражалась в стандартных единицах (количество сперматозоидов/мкл), что аналогично подсчету содержания клеточных элементов в слизи.

Подвижность сперматозоидов в цервикальной слизи классифицируется по следующим категориям: а) быстрое поступательное движение; б) медленное и вялое поступательное движение; в) непоступательное движение; г) неподвижные сперматозоиды. Наличие любого числа сперматозоидов с быстрым поступательным движением является наиболее важным индикатором нормальной функции цервикальной слизи.

Интерпретация результатов. Целью посткоитального теста является не только определение числа активных сперматозоидов в цервикальной слизи, но и оценка выживаемости и поведения сперматозоидов спустя много часов после полового сношения (роль резервуара). Следовательно, проведение теста через 9–24 ч является оптимальным для оценки жизнеспособности и выживаемости сперматозоидов. Тест, как правило, проводят не позднее чем через 6–10 часов после полового акта, однако промежуток времени в 9–24 ч также допустим. В протоколах исследования эякулята ВОЗ (1987 г.) посткоитальный тест имел количественную оценку: более 25 сперматозоидов (категория а и б) в поле зрения препарата оценивалось как хороший показатель, 10 и более сперматозоидов с поступательным движением – удовлетворительный, 5 и менее сперматозоидов в поле зрения, особенно если их движение вялое, медленное (категория в), – показатель снижения числа сперматозоидов и их подвижности или патологии цервикальной слизи. В последних рекомендациях ВОЗ считается, что наличие в слизи цервикального канала любого числа сперматозоидов с быстрым поступательным движением (категория а или б) является хорошим результатом.

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

Тесты *in vitro*

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

Если целью проведения теста взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью является сравнение качества различных образцов цервикальной слизи, то следует использовать один образец эякулята с оптимальными характеристиками концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов. Если необходимо оценить качество различных образцов эякулята, следует использовать один и тот же образец цервикальной слизи, чтобы иметь представление о способности сперматозоидов к пенетрации этой слизи. Если при использовании эякулята мужа и слизи жены получился отрицательный результат теста, то можно провести перекрестное тестирование со сперматозоидами и цервикальной слизью доноров, чтобы определить, сперматозоиды и/или цервикальная слизь ответственны за патологический результат. Донорскую цервикальную слизь можно получить от женщин, которым проводят искусственную инсеминацию в середине менструального цикла. Цервикальную слизь следует собирать перед инсеминацией в естественном цикле или в цикле стимуляции овуляции гонадотропинами.

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

Упрощенный тест на предметном стекле. Каплю цервикальной слизи наносят на предметное стекло и покрывают покровным стеклом. Толщину препарата можно сделать стандартной, нанеся на покровное стекло силиконовую жидкость, содержащую стеклянные шарики толщи-

ной 100 мкм. Возле каждого края покровного стекла наносят по капле эякулята, причем так, чтобы эякулят соприкасался с краями покровного стекла и под действием капиллярной силы проникал под него. При этом образуется поверхность соприкосновения эякулята с цервикальной слизью.

Инкубируют препарат во влажной камере при температуре 37 °С в течение 30 мин.

Через несколько минут в местах соприкосновения семенная жидкость образует пальцевидные выступы («фаланги»), которые проникают в слизь. Большая часть сперматозоидов пенетрирует в образовавшиеся «фаланги», прежде чем проникнуть в слизь. Попав в цервикальную слизь, сперматозоиды рассеиваются и двигаются хаотично. Некоторые возвращаются в семенную плазму, но большая часть продолжает мигрировать в глубь цервикальной слизи, пока не встретит препятствие (клеточный детрит или лейкоциты).

Интерпретация результатов. Оценка теста на предметном стекле субъективна, так как невозможно стандартизировать размер и форму поверхности соприкосновения между эякулятом и цервикальной слизью на препарате. Следовательно, рекомендуется использовать данный тест только для качественной оценки взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью.

Из теста можно сделать следующие полезные наблюдения:

1. Сперматозоиды пенетрируют в слизь, и более 90% из них имеют отчетливую прогрессивную подвижность (нормальный результат).
2. Сперматозоиды пенетрируют в слизь, но большинство не продвигается дальше, чем на 500 мкм (т. е. около десяти длин сперматозоида) от поверхности соприкосновения эякулята со слизью (плохой результат).
3. Сперматозоиды пенетрируют в слизь, но быстро теряют подвижность или их движения становятся «колебательными» (неблагоприятный результат, указывающий на присутствие антиспермальных антител).
4. Пенетрации сперматозоидов в слизь не происходит. «Фаланги» не образуются или могут образоваться, но сперматозоиды скапливаются вдоль границы соприкосновения с цервикальной слизью (неблагоприятный результат).

Биохимическое исследование спермы

Биохимические факторы, влияющие на сперматогенез

В последнее десятилетие большое внимание уделяется окислительному стрессу как фактору, вызывающему снижение жизнеспособности сперматозоидов. Окислительный стресс возникает в результате недостаточности антиоксидантных систем, необходимых для нейтрализации свободных радикалов, постоянно образующихся в клетках в процессе жизнедеятельности. Накопление свободных радикалов приводит к перекисному окислению липидов в клеточных мембранах и нарушению функций последних; кроме того, могут образовываться перекиси нуклеиновых оснований ДНК, что служит причиной разрывов цепи ДНК и изменения структуры хроматина. В многочисленных исследованиях выявлена зависимость между высоким уровнем свободных радикалов в сперме и снижением подвижности и повреждением ядерной ДНК сперматозоидов. По-видимому, окислительный стресс в конечном итоге приводит к гибели половых клеток. У больных с идиопатическим бесплодием часто обнаруживают повышение содержания в сперме свободных радикалов кислорода и цистеиновых протеиназ

(каспаз), принимающих участие в процессе апоптоза, и их активатора цитохрома *c*; при этом выявляется отрицательная корреляционная связь между уровнем каспаз и подвижностью, концентрацией и морфологической сохранностью сперматозоидов. В сперматозоидах имеются ферментные системы, защищающие их от свободнорадикального окисления; тем не менее основную защиту им обеспечивает, по-видимому, семенная жидкость, содержащая основные антиоксидантные ферменты – супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу.

В эякуляте также содержатся ферменты, осуществляющие апоптоз, причем в наибольшем количестве в сперме мужчин, страдающих бесплодием. Активация этих ферментов происходит под влиянием не только окислительного стресса, но и вирусной инфекции, злокачественных новообразований, гиперпролактинемии, избыточного потребления алкоголя и других воздействий, вызывающих снижение выработки сперматозоидов, уменьшение их подвижности и усиленную фрагментацию их ДНК.

Биохимический состав эякулята

Поддержание функциональной активности сперматозоидов осуществляется спермоплазмой, в которой содержатся белки, ферменты, микроэлементы, фруктоза, лимонная кислота, карнитин и другие метаболиты. Спермоплазма представляет собой смесь секретов добавочных половых желез. Нормальная деятельность этих желез обеспечивается андрогенными гормонами. Тестостерон стимулирует образование фруктозы в семенных пузырьках, лимонной кислоты, микроэлементов – в предстательной железе, карнитина – в придатках яичка; поэтому уровень этих метаболитов в спермоплазме может косвенно свидетельствовать об андрогенной насыщенности организма и функциональном состоянии желез мужской половой системы.

Фруктоза в норме секретуруется семенными пузырьками. Секреция фруктозы – важная функция

семенных пузырьков, она обеспечивает поддержание обмена веществ и подвижности сперматозоидов. Нормальная концентрация фруктозы в спермоплазме – 6,7–33,3 мкмоль/мл. Снижение жизнеспособности сперматозоидов сопровождается повышением уровня фруктозы в спермоплазме. Воспаление семенных пузырьков приводит к снижению фруктозы в спермоплазме. Определение фруктозы в спермоплазме имеет диагностическое значение для оценки уровня проходимости семявыводящих путей. Отсутствие (очень низкая концентрация) фруктозы в семенной плазме указывает на двухстороннюю атрезию или тяжелую дисфункцию семенных пузырьков или обструкцию семявыбрасывающего протока при фиброзном перерождении.

Врожденное двух- или одностороннее нарушение проходимости семявыносящих протоков

(отсутствие *vas deferens*) встречается или как отдельная аномалия, или как часть системной патологии – муковисцидоза – аутосомного рецессивного заболевания, вызванного мутацией в CFTR-гене (CFTR – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator – мембрано-связанный белок ионного канала). Среди жителей Кавказа такая аномалия встречается с частотой примерно 1 на 2500 детей. CFTR-ген имеет большие размеры, в нем выявлено более 700 различных мутаций. На рис. 165 представлены результаты исследования pH, объема и концентрации фруктозы в эякуляте при мутации в CFTR-гене.

При низкой активности фруктозы необходимо направить пациента на ультразвуковое исследование семенных пузырьков до и после эякуляции. В то же время фруктоза практически не используется как показатель активности эндокринной функции.

Концентрация лимонной кислоты отражает функциональное состояние предстательной железы. В норме ее более 20 ммоль/л.

Содержание карнитина в спермоплазме около 0,47 моль/л. Карнитин попадает в эякулят из придатка яичка (94%) и семенных пузырьков. Он участвует в переносе жирных кислот через мембрану сперматозоида и увеличивает их подвижность.

Существенное влияние на подвижность сперматозоидов и оплодотворяющие свойства эякулята оказывают такие микроэлементы, как *Fe, Mg, Mn, Zn*. Их секреция осуществляется в основном предстательной железой.

Спермоплазма содержит большое количество белков, которые секретируются главным образом предстательной железой и семенными пузырьками. В норме концентрация общего белка составляет 40–45 г/л.

Ключевыми ферментами процесса оплодотворения являются сериновая протеиназа, *акрозин* и *гиалуронидаза*, участвующие в акросомальной реакции. Их активность находится в прямой зависимости от концентрации сперматозоидов.

Исследование активности акрозина является прекрасным тестом для оценки фертильности при подготовке к искусственному оплодотворению. Содержание гиалуронидазы находится в прямой зависимости от концентрации сперматозоидов: с увеличением числа сперматозоидов ее концентрация в эякуляте возрастает.

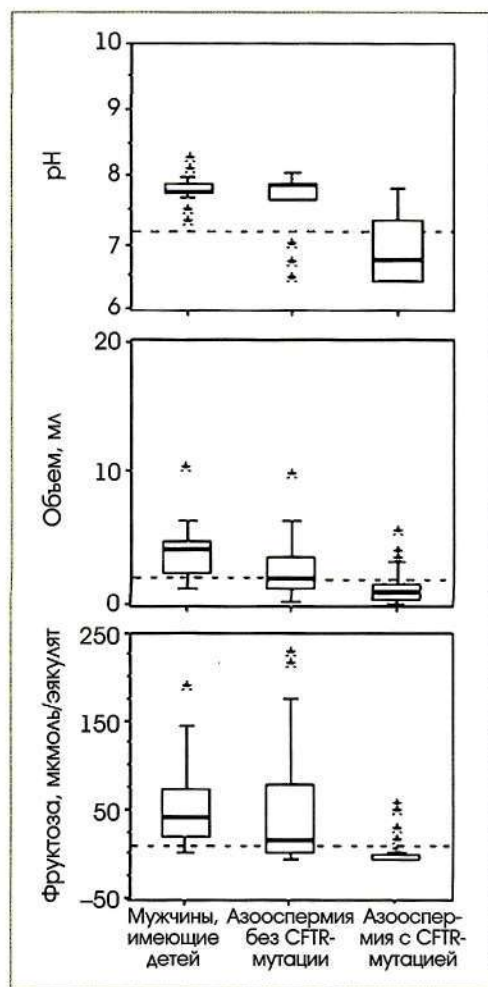


Рис. 165. pH, объем эякулята и концентрация в нем фруктозы у здоровых мужчин, имеющих детей и никогда не лечившихся от бесплодия, у мужчин с азооспермией, причина которой не связана с мутацией гена CFTR, и у мужчин с мутацией гена CFTR. При мутации гена CFTR развивается билатеральная атрезия семявыносящего протока или тяжелая дисфункция семенных пузырьков. Низкий уровень фруктозы в эякуляте указывает на отсутствие секрета семенных пузырьков. Данные адаптированы из: von Eckardstein et al. // *Fertil Steril* 2000; 73: 1226–1231

Методы определения компонентов эякулята

Методы определения концентрации фруктозы

Концентрация фруктозы в сперме тесно связана с уровнем тестостерона в организме. Снижение продукции тестостерона сопровождается уменьшением концентрации фруктозы в сперме. Определение скорости катаболизма фруктозы характеризует интенсивность метаболизма фруктозы в сперматозоидах.

Классическим методом определения концентрации фруктозы в сперме является метод Рое.

Принцип: фруктоза в сильнокислой среде образует ω-оксиметилфурфурол, который дает с резорцином вещество, окрашенное в ярко-красный цвет.

Ход определения. К 0,1 мл эякулята или спермоплазмы добавляют 0,4 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), перемешивают и через 10 мин центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Отбирают 0,1 мл супернатанта, к нему добавляют 2,5 мл 30% раствора соляной кислоты и 0,25 мл 0,1% раствора резорцина в 95% этаноле, перемешивают и помещают в водяную баню при температуре 80–90 °С на 8 мин. Пробы охлаждают и фотометрируют при длине волны 530 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против холостой пробы. Холостую пробу готовят как опытную, но вместо эякулята добавляют 0,1 мл 10% раствора ТХУ. Окраска стабильна в течение 2–3 часов. Расчет концентрации фруктозы производят по калибровочному графику (табл. 13).

Таблица 13

Построение калибровочного графика для определения фруктозы

№	Маточный раствор, мл	Вода, мл	Концентрация фруктозы, ммоль/л
1	0,1	0,9	5,0
2	0,2	0,8	10,0
3	0,4	0,6	20,0
4	0,6	0,4	30,0
5	0,8	0,2	40,0
6	1,0	–	50,0

Из маточного калибровочного раствора фруктозы (0,05 моль/л) готовят ряд разведений.

Из каждого разведения отбирают по 0,1 мл и обрабатывают как опытную пробу.

По полученным значениям экстинкции строят калибровочный график. Расчет можно проводить по формуле:

$$\text{Фруктоза (ммоль/л)} = \frac{E_{\text{оп}} \times C_{\text{кал}}}{E_{\text{кал}}},$$

где $E_{\text{оп}}$ – экстинкция опытной пробы, $C_{\text{кал}}$ – концентрация фруктозы в калибровочной пробе, $E_{\text{кал}}$ – экстинкция калибровочной пробы.

Некоторое неудобство метода – большой объем пробы.

Микрометод определения концентрации фруктозы

В качестве хромогена используется тиобарбитуровая кислота.

Реактивы

1. Стандарт фруктозы 5,6 мкмоль/мл (1 мг/мл), содержащий 0,1% азиды натрия.
2. 3% раствор ТХУ.
3. 0,02 М водного раствора тиобарбитуровой кислоты (хромоген).
4. Концентрированная соляная кислота.

Ход определения

По 0,01 мл стандарта и спермоплазмы пипетируют в пробирки с 1 мл 3% ТХУ, перемешивают и через 10 мин центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант сливают полностью в пробирку со шлифом, добавляют по 1 мл раствора хромогена (реактив 3) и концентрированной соляной кислоты, пробирки закрывают и инкубируют в кипящей водяной бане 6 мин. Пробы охлаждают, смывают конденсат, измеряют оптическую плотность в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны, равной 433 нм, против холостой пробы, которая готовится как опытная, но вместо спермоплазмы добавляется 1 мл 3% ТХУ. Для измерения можно использовать любой ФЭК с фильтром близкой длины волны.

Метод линеен в диапазоне от 1,4 до 38,9 мкмоль/мл (0,25–7,0 мг/мл). Нормальные значения – 6,7–33,3 мкмоль/мл (1,2–6 мг/мл).

Определение концентрации лимонной кислоты

Концентрация лимонной кислоты отражает функциональное состояние предстательной железы и эндокринной функции яичек.

Принцип метода: при взаимодействии цитрата с уксусным ангидридом образуются лактоны, продукция которых ускоряется пиридином при нагревании. Продукты реакции имеют желтое ок-

рашивание. Калибровочный раствор лимонной кислоты 10 ммоль/л.

Схема определения представлена в табл. 14.

Расчет производится по формуле:

$$\text{Цитрат (ммоль/л)} = \frac{E_{оп} \times C_{кал}}{E_{кал}}$$

Референтные значения: >20 ммоль/л.

Таблица 14

Определение концентрации лимонной кислоты в эякуляте

Компонент	Опытная проба, мл	Калибратор, мл	Холостая проба, мл
10% раствор ТХУ	0,4	0,4	0,5
Эякулят	0,1	–	–
Калибратор	–	0,1	–
Перемешать, оставить при комнатной температуре на 10 мин, центрифугировать при 3000 об/мин в течение 10 мин			
Супернатант	0,1	0,1	0,1
Уксусный ангидрид	2,5	2,5	2,5
Перемешать, нагреть при 60 °С в течение 10 мин			
Пиридин	0,25	0,25	0,25
Перемешать, нагреть при 60 °С в течение 15 мин. После охлаждения измерить экстинкцию опытной и калибровочной пробы против холостой при длине волны 405 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см			

Определение концентрации цинка

Принцип метода

Цинк при рН 8,8 формирует со специфическим комплексантом 2-(5-бromo-2-пиридазол)-5-(N-пропил-N-сульфопропиламино)-фенолом (5-Br-ППФ) комплекс, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации цинка.

Реактивы

- А – 5 × 10 мл; буфер рН 8,8, добавки;
- В – 1 × 5 мл; комплексант 5-Br-ППФ;
- С – 1 флакон; усилитель реакции;
- Стандарт – раствор цинка 200 мкг/дл (30,6 мкмоль/л).

Приготовление реактивов

Раствор АС: 1 ложечку реактива С добавить во флакон с реактивом А, перемешать (срок хранения 30 дней при 2–8 °С).

Хромогенный раствор: 10 объемов р-ра АС + 1 объем реактива В (срок хранения 10 дней при 2–8 °С).

Ход определения

Эякулят центрифугируют при 3000 об/мин 10–15 мин. Супернатант разбавляют физиологическим раствором в 100 раз. При расчете концентрации цинка учитывают разведение.

Длина волны 560 нм, длина оптического пути 1 см, температура 25, 30 или 37 °С, соотношение объемов образца и реактива 1:20. Схема определения концентрации цинка представлена в табл. 15.

Таблица 15

Определение концентрации цинка в эякуляте

Компонент	Бланк	Образец	Стандарт
Вода, мкл	50	–	–
Образец, мкл	–	50	–
Стандарт, мкл	–	–	50
Хромоген, мкл	1000	1000	1000

Перемешать и измерить поглощение образца (As) и стандарта (Ast) против бланка при 560 нм. Окраска стабильна в течение 1 часа.

Расчет:

$$(As/Ast) \times 200 = \text{мкг Zn/дл образца}$$

или

$$(As/Ast) \times 30,6 = \text{мкмоль Zn/л образца.}$$

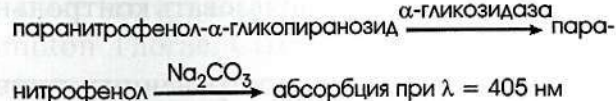
Референтные значения: 2–10 мкг/дл или 0,3–1,5 мкмоль/л.

Наборы для определения биохимических маркеров фертильности (лимонная кислота, фруктоза, акросомальный белок акрозин и др.) можно приобрести в компании «БиоХимМак».

Определение концентрации нейтральной α -гликозидазы в семенной плазме

В семенной плазме содержатся как нейтральный изоэнзим α -гликозидазы, вырабатываемый в придатке яичка, так и кислый изоэнзим, вырабатываемый в предстательной железе. Кислый изоэнзим селективно ингибируют. Для оценки функции придатка яичка измеряют его специфический маркер – нейтральную α -гликозидазу. Имеются коммерческие наборы для измерения α -гликозидазы в плазме эякулята. Наборы подходят для планшетных ридеров с 96 ячейками. Объемы эякулята и реагентов можно пропорционально изменять для спектрофотометра, используя кюветы с объемом 1 и 3 мл. При подсчете результатов следует внести соответствующие коррективы.

Принцип метода



Реагенты

Фосфатный буфер 0,2 моль/л, рН 6,8: приготовить 0,2 М $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (растворить 4,56 г в 100 мл) и 0,2 М KH_2PO_4 (растворить 2,72 г в 100 мл). Смешивать объемы, пока рН не достигнет 6,8.

Буфер, содержащий 1% раствор додецил-сульфата натрия (ДДС): растворить 1 г ДДС в 100 мл полученного буфера. При хранении при 4 °С буфер выпадает в осадок, однако при осторожном нагревании происходит растворение осадка.

Цветной реагент 1 (для остановки реакции): 0,1 М $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Растворить 6,20 г $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ в 500 мл воды.

Цветной реагент 2 (для разведения): смесь цветного реагента 1 и 1% раствора ДДС.

Субстрат – паранитрофенол- α -гликопиранозид (ПНГП), 5 г/л: нужное количество готовить перед каждым анализом, растворяя 1 г ПНГП (Sigma) в 20 мл буфера, содержащего 1% раствор ДДС. Раствор нагреть, помешивая при 50 °С в течение 10 мин. Некоторые кристаллы могут не раствориться. Хранить рабочий раствор при 37 °С.

Ингибитор гликозидазы для контрольных образцов эякулята (кастаноспермин): основной раствор (10 мМ) получают, растворив 1 мг кастаноспермина (Sigma) в 10 мл воды. Рабочий раствор (1 мМ) получают добавлением нужного объема воды. Хранить в аликвотах при –20 °С.

Стандартный раствор – 5 мМ паранитрофенола (ПНФ): растворить 0,0695 г ПНФ (Sigma) в 100 мл воды. При необходимости нагреть раствор. Хранить при 4 °С в темно-коричневых бутылках. Готовить свежий стандартный раствор каждые 3 месяца.

Ход определения

Построить калибровочный график (в течение последнего часа инкубации):

- поместить 0,4 мл основного раствора ПНФ (5 мМ) в мерную колбу объемом 10 мл и довести объем до 10 мл, добавив цветной реагент 2 (200 мкМ);
- развести 200 мкМ стандарта цветным реагентом 2 для получения дополнительных стандартов – 160, 120, 80 и 40 мкМ раствора ПНФ. Приготовить образцы:
- эякулят центрифугировать при 1000 g в течение 10 мин, затем забрать семенную плазму. До анализа плазму хранить при –20 °С;
- плазму разморозить и тщательно размешать на вортекс-миксере (в каждое исследование включать контрольные образцы, содержащие нейтральную α -гликозидазу с высокой, средней и низкой активностью);
- пипеткой перенести в пробирки объемом 1,5 мл два образца эякулята (по 15 мкл). Также перенести в пробирки два контроля (по 15 мкл воды), по два контрольных образца, содержащих гликозидазу с низкой и средней активностью, и четыре контрольных образца, содержащих гликозидазу с высокой активностью;
- добавить в два контрольных образца, содержащих гликозидазу в высокой концентрации, 8 мкл кастаноспермина (1 мМ);
- добавить по 100 мкл раствора ПНГП (при 37 °С) в каждую 1,5 мл пробирку Эппендорфа;
- перемещать каждую пробирку на вортекс-миксере и инкубировать в течение 2 часов при 37 °С (необходимо точно соблюдать температурный и временной режимы);
- через 2 часа остановить инкубацию, добавить по 1 мл цветного реагента 1 и перемешать;

- перенести по 250 мкл образцов и стандартов в 96-луночную плашку;
- измерить абсорбцию при длине волны 405 нм в планшет-ридере в течение 60 мин, используя воду в качестве контроля для установки нулевого значения.

Расчет результатов

1 единица (ЕД) активности α -гликозидазы = продукция 1 мкмоль ПНФ за 1 мин инкубации при температуре 37 °С. В этом исследовании активность выводится от 15 мкл эякулята при общем объеме 1,115 мл за 120 мин, следовательно, коэффициент коррекции будет составлять $1115/15/120 (=0,6194)$.

Определить концентрацию полученного ПНФ в образце по калибровочному графику (мкМ).

Умножить результат на коэффициент коррекции (0,6194) для получения активности нейтральной

ной гликозидазы в неразведенной семенной плазме (ЕД/л).

Вычитать от каждого полученного результата активность (ЕД/л) контрольных образцов эякулята, содержащих кастаноспермин, для получения скорректированных (относящихся к гликозидазе) значений активности.

Умножить скорректированный результат на объем эякулята для получения значения активности гликозидазы (МЕ/эякулят).

Следует забраковать результаты, выходящие за рамки верхнего стандарта, а измерение повторить после разведения.

Референтные значения: 20 МЕ в эякуляте (минимальное значение).

Для биохимического исследования эякулята существуют также готовые наборы реактивов (например, «Ferti Pro», Бельгия)

Контроль качества исследований эякулята

Впервые в последней редакции протокола ВОЗ так много внимания уделяется вопросам контроля качества работы андрологической лаборатории. Большинство тестов относится к категории количественных, и для них справедливы общие правила внутреннего контроля качества.

Для тестов, выполняемых вручную (концентрация, подвижность, морфология, исследование живых сперматозоидов), возможность ошибок существенно больше, чем для автоматизированных исследований. По природе ошибки можно отнести к случайным, чаще вызванным погрешностями в выполнении протокола, и систематическим, связанным с постоянным отклонением в измерениях (износ или неправильная калибровка измерительных или дозирующих инструментов, наличие постоянного неблагоприятного фактора).

Случайные ошибки обнаруживаются при повторном измерении одного и того же параметра (например, подвижности). Поэтому при исследовании параметров рекомендуется производить двойной подсчет. Систематические ошибки можно обнаружить только при тестировании референтных контрольных образцов или при глубоком ретроспективном анализе. Для выявления таких ошибок рекомендуется тщательно следить

за метрологической проверкой приборов измерения и дозирования, использовать контрольные материалы.

Одна из самых распространенных причин ошибки – недостаточная статистическая выборка при подсчете категорий (например, морфологии или подвижности). Это наглядно видно на рис. 166, взятом из протокола ВОЗ.

При увеличении статистической выборки увеличивается воспроизводимость измерения (разница между двумя подсчетами снижается). Очевидно

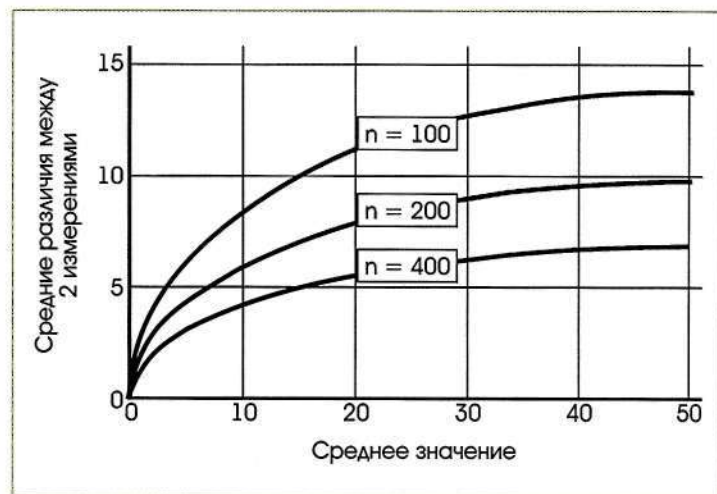


Рис. 166. Допустимая разница между двумя подсчетами категории при разной статистической выборке

но, что чем больше выборка, тем точнее результат. Однако необходимо найти наиболее приемлемое значение, учитывая баланс между точностью параметра, его клинической значимостью и трудовыми затратами на его получение. Например, для изучения морфологии приемлема выборка из 200 сперматозоидов.

Для оценки качества работы нужно проводить рутинные процедуры контроля с построением контрольных карт, расчетом контрольных пределов. Эти вопросы подробно изложены в ряде монографий и учебных пособий (например: Долгов В.В., Мошкин А.В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике. Практическое руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. М.: Медгиз, 2004), можно приобрести коммерческие компьютерные программы по контролю качества (например, фирмы «Аналитика»).

При проведении работ по контролю качества возникают определенные сложности с выбором контрольного материала. Во всех случаях лучшими считаются коммерческие контрольные материалы (например, ACCU-BEADS Hamilton Thorne, США) с показателями в диапазонах нормальных и патологических значений. Для контроля подсчета концентрации сперматозоидов можно использовать замороженный порционно эякулят, для контроля подвижности – криоконсервированную сперму (охлажденную до сверхнизких температур в среде криопротектора; обычно это практикуется в лабораториях ВРТ). Однако это в большинстве случаев трудновыполнимо, поэтому можно собрать коллекцию видеозаписей, сделанных в поле зрения микроскопа (существуют коммерческие видеозаписи). Для контроля подсчета морфологии и доли живых сперматозоидов необходимо иметь коллекцию окрашенных препаратов.

Особое внимание необходимо уделить применяемым инструментам. Счетные камеры многократного использования постепенно изнашиваются, внося значительную долю погрешности. Поэтому каждую новую камеру необходимо протестировать перед использованием и затем периодически проверять (частота зависит от интенсивности использования). Протестировать ее можно либо с помощью контрольного материала, либо с помощью качественного микроскопа.

Для этого необходимо нанести на покровное стекло камеры метку маркером, затем измерить расстояние (по шкале фокусирующего механизма микроскопа) между покровным стеклом с учетом его толщины и сеткой на дне камеры. Измерение провести несколько раз, сверить полученное расстояние с паспортным. Если камера имеет видимые следы механического износа, то использовать ее не нужно. Дозирующие пипетки необходимо подвергать метрологическому контролю не реже одного раза в год. Также следует периодически проверять термостаты, термометры, весы, рН-метры и др.

Помимо процедур внутреннего контроля качества, необходимо проводить внешний контроль. Для этого можно участвовать в программах контроля качества (ФСВОК, Россия; Labquality, Финляндия) или специальных семинарах, проводимых, например, под патронажем европейской ассоциации ESHRE или скандинавской NAFA.

В ФСВОК циклы по внешнему контролю качества микроскопического исследования эякулята начались в 2001 г. В каждом цикле лабораториям предлагается по 4 микрофотографии с нативных и окрашенных азур-эозином препаратов, приготовленных из нормального и патологического эякулята. На микрофотографиях с нативных препаратов при увеличении $\times 400$ нужно определить такие элементы патологической спермы, как агрегация и агглютинация, кристаллы спермина. В нативных препаратах при увеличении $\times 1000$ (иммерсия) необходимо отмечать патологию головки, шейки или хвоста сперматозоидов и круглые клетки. В препаратах, окрашенных азур-эозином, при увеличении $\times 1000$ предлагается задание по выявлению патологии головки, шейки и хвоста сперматозоидов и дифференциации круглых клеток. Окраску препаратов азур-эозином проводят на автомате «Нема-Тек» фирмы «Bayer», обеспечивающем постоянство высокого качества окраски.

Если в первых циклах приняло участие всего 8 лабораторий, то в 2005 г. количество участников увеличилось до 185.

В течение 4 лет участники данного раздела стали лучше распознавать патологию сперматозоидов (табл. 16).

Трудности в узнавании вызвали круглые клетки – клетки сперматогенеза, остаточные тельца,

Результаты распознавания патологии сперматозоидов
в 7 циклах внешнего контроля качества ФСВОК

№ цикла	Патология головки		Патология шейки		Патология хвоста	
	Верно	Неверно	Верно	Неверно	Верно	Неверно
1	31	115				
2	56	90				
3	114	16				
4	103	27	55	91		
5	159	25	133	47	87	59
6	150	34	126	54	97	83
7	138	46	144	58	155	25

макрофаги, спермиофаги, моноциты, нейтрофилы, а также трихомонады. Примерно половина ответов, а иногда и более, оказывались неправильными, хотя по клеткам сперматогенеза (рис. 167) в препарате, окрашенном азур-эозином, процент правильных ответов был достаточно высоким.

Вниманию участников внешнего контроля качества была предложена микрофотография препарата, окрашенного азур-эозином, с круглыми и вытянутыми сперматидами (рис. 168).

В препарате, окрашенном азур-эозином, была представлена трихомонада (рис. 169), которую

«не узнали» 88 из 180 участников. В замечаниях к присланным микрофотографиям участники цикла отмечали, что подобные элементы в окрашенных препаратах они просто игнорируют, а это является гиподиагностикой, вызванной незнанием морфологии этих простейших.

Тем не менее от цикла к циклу отмечается тенденция к увеличению количества правильных ответов по элементам эякулята. Из табл. 17 следует, что имеет место тенденция к увеличению количества лабораторий, присылающих от 80 до 100% правильных ответов, и снижению –

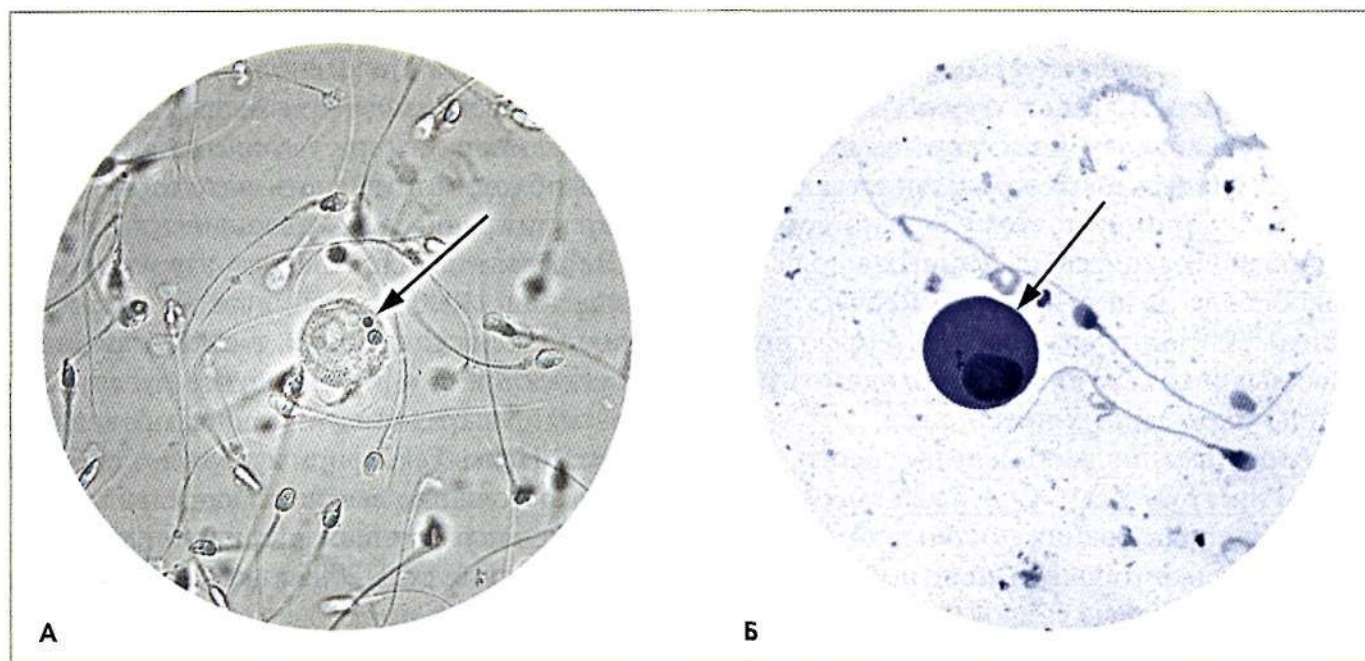


Рис. 167. Нативный (А) и окрашенный азур-эозином (Б) препараты эякулята, фотографии которых предлагались для идентификации круглой клетки в цикле ФСВОК. В нативном препарате при увеличении $\times 1000$ из 82 участников клетку сперматогенеза «не узнали» в 44 лабораториях (54%), в препарате, окрашенном азур-эозином, число неправильных ответов было 20 из 82 (24%)

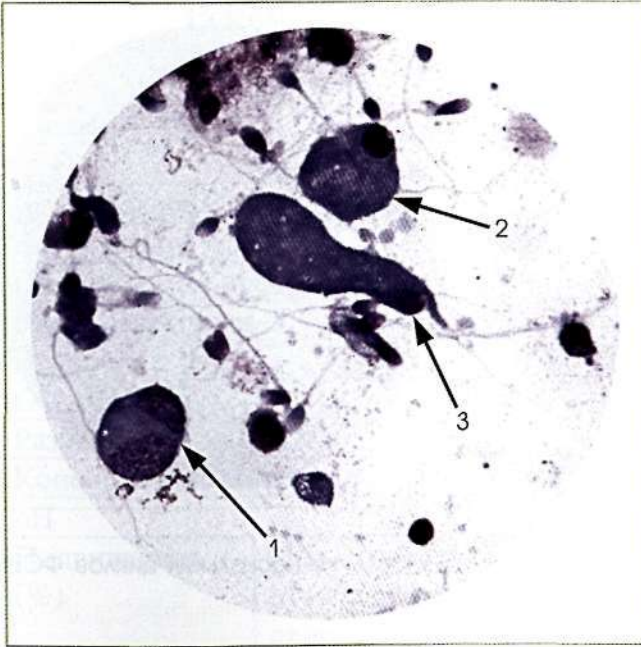


Рис. 168. Микрофотография окрашенного препарата спермы, содержащего сперматиды, предлагаемая участникам ФСВОК. Результаты: круглую сперматиду (1) «не узнали» 53 лаборатории, сперматиду (2) – 86 лабораторий, а вытянутую сперматиду (3) – 103 лаборатории, причем в большинстве лабораторий ее приняли за трихомонаду

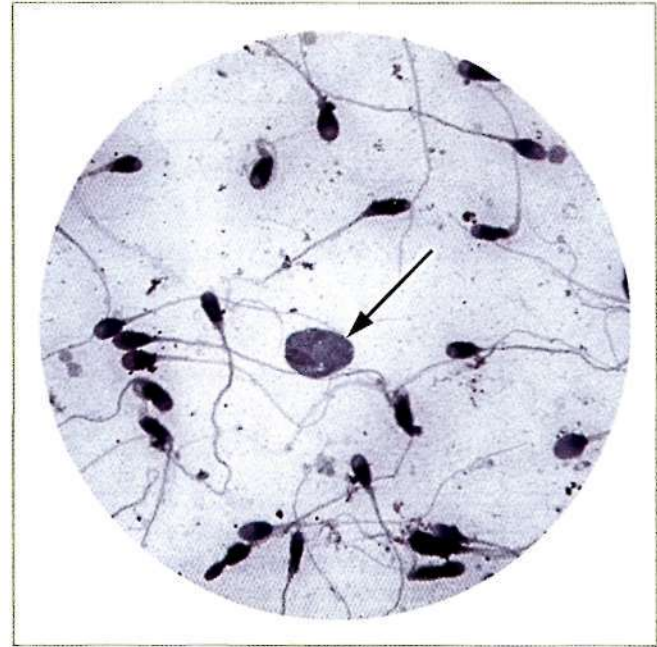


Рис. 169. Трихомонада в препарате спермы. Участники ФСВОК трихомонаду приняли за моноцит, клетку эпителия, но большинство – за клетку сперматогенеза

Таблица 17

Количество лабораторий – участников циклов ФСВОК 2001–2004 гг., давших соответствующий % правильных ответов

% правильных ответов	Цикл 2-01	Цикл 3-01	Цикл 1-02	Цикл 2-02	Цикл 1-03	Цикл 2-03	Цикл 1-04	Цикл 2-04
100	21	0	0	2	4	2	9	11
80	21	0	1	12	5	15	14	90
60	15	2	30	31	29	53	83	58
40	8	4	53	31	57	22	57	22
20	0	1	16	5	33	13	17	3
1	0	1	0	1	13	4	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0
Всего участников	65	8	100	82	142	123	180	184

присылающих только 1–20% правильных ответов.

По мере участия лабораторий в ФСВОК количество правильных ответов по патологии головки, шейки и хвоста сперматозоидов увеличивается. Так, например, в диагностике патологии сперматозоидов, у которых хвост закручивался в виде кольца, отмечалась такая динамика. Вначале сперматозоид с закрученным хвостом (рис. 170, А) не узнавали в 76% лабораторий, в следующем цикле не-

правильно ответили 39% лабораторий (рис. 170, Б), в последнем цикле – 46% участвующих (рис. 170, В). Некоторое увеличение процента неправильных ответов в последнем цикле объяснялось тем, что в число участников по контролю качества включились новые лаборатории, не принимавшие участия в предыдущих циклах.

Таким образом, участие в ФСВОК дает лабораториям несомненную помощь и носит не только контрольную, но и обучающую функцию.

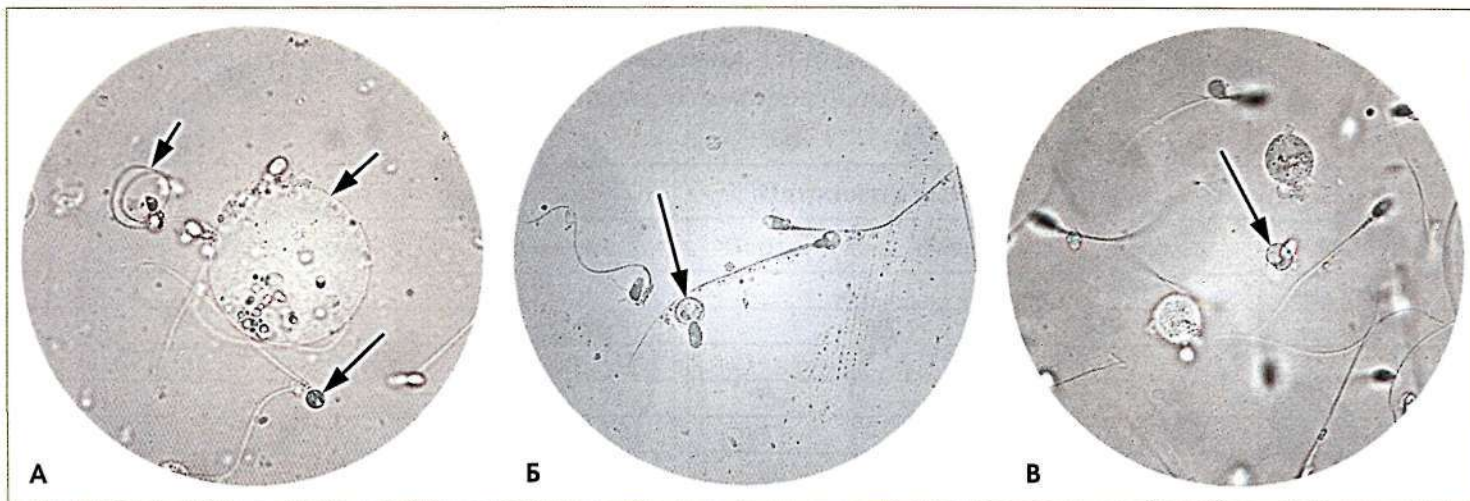


Рис. 170. Микрофотографии спермы (нативный препарат, $\times 1000$), на которых участники нескольких циклов ФСВОК должны были идентифицировать сперматозоид с хвостом, закрученным в виде кольца

Непрерывное обучение

Очень важный аспект работы андрологической лаборатории – непрерывное повышение квалификации. Развитие андрологии и репродуктивной медицины меняет представления о существующих понятиях очень быстро. Практически каждые 5 лет издается новый протокол по проведению исследования, при этом он кардинально перерабатывается. Для того чтобы диагностика была на высоком уровне, необходимо в лаборатории разрабатывать систему непрерывного обучения и аттестации персонала.

Для самоподготовки используются, например, электронные учебники, один из которых представлен на рис. 171.

На кафедре клинической лабораторной диагностики Российской медицинской академии последиplomного образования (Москва, тел. (095) 945-82-22, тел./факс (095) 945-84-00) систематически проводятся 2-недельные циклы тематического усовершенствования «Лабораторные исследования эякулята», организованные для

врачей клинической лабораторной диагностики, работающих как в андрологических, так и в общелечебных клиниках.



Рис. 171. Пример обучающей и тестирующей программы по исследованию морфологии сперматозоидов по «строгим критериям»

495
 Наталья
 Геннадьевна
 Ракова

**Рекомендуемые бланки для исследования спермы и гормонов
в клиничко-диагностической лаборатории**

Анализ спермы		Дата рождения		
Ф. И. О.				
Дата исследования				
Воздержание от семяизвержения (дни)				
Принимаемые препараты				
Время эякуляции				
Начало анализа				
Объем эякулята (мл)				
Разжижение				
Консистенция (вязкость)				
рН				
Подвижность (%)	a) быстрое поступательное движение			
	b) медленное поступательное движение			
	c) непоступательное движение			
	d) неподвижные сперматозоиды			
Количество	Концентрация сперматозоидов (миллион/мл)			
	Общее количество в эякуляте (миллионов)			
Морфология сперматозоидов	Нормальные (%)			
	Дефекты головки (%)			
	Дефекты шейки (%)			
	Дефекты хвоста (%)			
	Цитоплазматическая капля (%)			
Специфические дефекты				
Жизнеспособность (% окрашенных эозином клеток)				
Гипоосмотическое набухание (% набухших клеток)				
Круглые клетки (миллион/мл)				
Лейкоциты (миллион/мл)				
Агглютинация (%)				
MAR-тест	IgG (%)			
	IgA (%)			
Фруктоза (6,7–33,3 мкмоль/мл)				
Zn ($\geq 2,4$ мкмоль на эякулят)				
α -гликозидаза (≥ 20 МЕ в эякуляте)				
Другие тесты				
Врач				

Анализ гормонов				
ЛГ (2–10 Ед/л)				
ФСГ (1–7 Ед/л)				
Пролактин (≤ 500 МЕ/л)				
Тестостерон (утром ≥ 12 нмоль/л)				
Эстрадиол (≤ 250 пмоль/л)				
ТЭСГ (11–71 нмоль/л)				
ПСА (≤ 4 мкг/л)				
Врач				

Дата: 02.11.2005

Название учреждения _____

Время получения эякулята: _____

Ф. И. О. _____

Возраст _____

СПЕРМОГРАММА

Показатели	Значения нормы
Воздержание (дней)	2-7

АНАЛИЗ СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ

Объем эякулята	2 мл и более
Цвет и консистенция	Нормальные
pH	7,2-8,0
Вязкость	До 2 см
Разжижение	До 60 мин
Концентрация круглых клеток	Менее 5 млн/мл
Концентрация лейкоцитов	Менее 1 млн/мл
Эритроциты	Отсутствуют
Липоидные тельца	Немного
Амилоидные тельца	Отсутствуют

АНАЛИЗ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Концентрация сперматозоидов	20 млн/мл и более
Подвижность сперматозоидов (%): а) с быстрым поступательным движением б) с медленным поступательным движением в) с непоступательным движением г) неподвижные сперматозоиды	50% и более категории а и в или 25% и более категории а
Жизнеспособность сперматозоидов (% живых)	75% и более
Морфология (%): нормальные сперматозоиды патологические формы	14% и более
Клетки сперматогенеза	2-4 на 100 сперматозоидов
Тест на антитела (MAR IgA)	Менее 50%
Тест на антитела (MAR IgG)	Менее 50%
Агглютинация сперматозоидов	Отсутствует
Агрегация сперматозоидов	Отсутствует
Эпителий	
Макрофаги	Отсутствуют

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: нормальный эякулят (нормозооспермия), астенозооспермия, олигозооспермия, тератозооспермия, криптозооспермия, азооспермия, аспермия, лейкоспермия, гемоспермия.
Связанные с антителами сперматозоиды, нормальный эякулят с агглютинацией или патологией семенной жидкости

Подпись:

БИБЛИОГРАФИЯ

1. *Адаскевич В.П.* Инфекции, передаваемые половым путем: Руководство для врачей. М.: Медицинская книга, 2004.
2. *Билич Г.Л., Божедомов В.А.* Репродуктивная функция и сексуальность человека. М., 1998.
3. *Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А.* Руководство по сперматологии. М., 2002.
4. *Ильин И.И.* Негонokokковые уретриты у мужчин. М.: Медицина, 1991.
5. *Каган С.А.* Стерильность у мужчин. М., 1974.
6. *Кеттайл В.М., Арки Р.А.* Патофизиология эндокринной системы. М.; С.-Пб., 2001. С. 225–274.
7. *Леонтьева О.А., Воробьева О.А.* Сравнительный анализ морфологии сперматозоидов человека: нативный эякулят – прогрессивно подвижная фракция // Проблемы репродукции. 1999. № 3. С. 29–36.
8. *Лоран О.Б., Сегал А.С.* Климактерические расстройства у мужчин. М., 1999.
9. *Мироснова И.И., Романова Л.А., Долгов В.В.* Общеклинические исследования (моча, кал, ликвор, эякулят). М., 2005. С. 165–195.
10. *Назарова Е.К., Зенина М.Н.* Хламидийная инфекция: Цитология, иммунофлюоресценция. С.-Пб., 2004.
11. *Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью.* 4-е изд. М.: МедПресс, 2001.
12. *Руководство по андрологии / Под ред. О.Л. Тиктинского.* Л., 1990.
13. *Сагалов А.В.* Амбулаторно-поликлиническая андрология. М.: Медицинская книга; Н. Новгород: Изд-во НГМА, 2003.
14. *Тер-Ованесов Г.В.* Андрологические аспекты бесплодного брака. М.: НЦАГиП РАМН, 2000.
15. *Хеффнер Л.* Половая система в норме и патологии. М., 2003.
16. *Хэм А., Кормак Д.* Гистология. М., 1983. Т. 5. С. 183–219.
17. *Becker K.L. (Ed.).* Principles and practice of endocrinology and metabolism. Third edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
18. *Fredricsson B., Bjork R.* Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance // *Fertil. Steril.* 1977; 28: 841–845.
19. *Kruger T.F., Acosta A.A., Simmons K.F. et al.* Predictive value of abnormal sperm morphology in *in vitro* fertilization // *Fertil. Steril.* 1988; 49: 112–117.
20. *Kruger T.F., Menkveld R., Stanger F.S.H. et al.* Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization // *Fertil. Steril.* 1986; 46: 1118–1123.
21. *Mortimer D., Leslie E.E., Kelley R.W., Templeton A.A.* Morphological selection of human spermatozoa *in vivo* and *in vitro* // *J. Reprod. Fertil.* 1982; 64: 391–399.
22. *Nieschlag E., Behre H.M. (Eds.).* Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction. 2nd edition. Berlin: Springer, 2000.
23. *Rosner W., Hryb D.J. et al.* Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1999; 69: 481–485.
24. *WHO Task Force on the Diagnosis and Treatment of Infertility.* Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility // *Int. J. Androl [Suppl]* 1987; 7.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3	<i>Белки, связывающие гормоны</i>	32
ВВЕДЕНИЕ	5	<i>Тестостерон-эстрадиол-связывающий</i>	
МУЖСКАЯ РЕПРОДУКТИВНАЯ		<i>глобулин (ТЭСГ; или секс-гормон-</i>	
СИСТЕМА	7	<i>связывающий глобулин,</i>	
Строение мужской половой системы	7	<i>SHBG; или половые стероиды</i>	
<i>Развитие половых желез</i>	8	<i>связывающий глобулин, ПССГ)</i>	32
Яичко	8	<i>Андроген-связывающий белок</i>	33
<i>Кровоснабжение яичек</i>	9		
<i>Клеточный состав яичек</i>	10	МУЖСКОЕ БЕСПЛОДИЕ	34
Придаток яичка (эпидидимис)	13	Классификация и причины бесплодия	
Семявыносящий проток	14	у мужчин	34
Добавочные половые железы	14	Варикоцеле	35
<i>Семенные пузырьки</i>	14	Экскреторное бесплодие	36
<i>Бульбоуретральные железы</i>	15	Эндокринные нарушения	36
<i>Парауретральные железы</i>	15	Мужской гипогонадизм,	
<i>Предстательная железа</i>	15	или тестикулярная недостаточность ...	36
Сперматогенез	16	<i>Первичный врожденный</i>	
Гормональная регуляция сперматогенеза ...	19	<i>гипогонадизм</i>	39
Ось гипофиз-гипоталамус-гонады	20	<i>Первичный приобретенный</i>	
<i>Гонадотропный рилизинг-гормон</i>	20	<i>гипогонадизм</i>	39
<i>Фолликулостимулирующий</i>		<i>Вторичный врожденный</i>	
<i>и лютеинизирующий гормоны</i>	21	<i>гипогонадизм</i>	40
Методические аспекты		<i>Вторичный приобретенный</i>	
определения ФСГ и ЛГ	22	<i>гипогонадизм</i>	41
<i>Пролактин</i>	24	Лабораторная диагностика	
Тестостерон	24	мужского гипогонадизма	43
<i>Биосинтез тестостерона</i>	24	<i>Базовая гормональная диагностика</i> ...	43
Механизм действия		<i>Молекулярно-генетические</i>	
<i>тестостерона на клетки-мишени</i>	26	<i>исследования</i>	46
Биологические эффекты		Инфекционно-воспалительные	
<i>тестостерона</i>	27	заболевания половых органов	46
Методические аспекты		Гонорея	48
определения тестостерона	28	<i>Лабораторная диагностика гонореи</i> ...	49
Общий тестостерон	28	Урогенитальный хламидиоз	51
Свободный тестостерон	28	<i>Строение хламидий</i>	51
Биодоступный тестостерон	29	<i>Цикл развития хламидий</i>	51
Эстрогены	30	Клинические проявления	
Гормоны роста	30	<i>хламидийной инфекции</i>	53
<i>Ингибин и активин</i>	30	Диагностика урогенитального	
<i>Инсулиноподобный фактор роста I</i>		<i>хламидиоза</i>	53
<i>(IGF-I) и трансформирующий</i>		<i>Техника взятия материала</i>	
<i>фактор роста (TGF-α)</i>	32	<i>для исследования</i>	54

<i>Мочеполовой трихомоноз</i>		<i>Метод подсчета подвижности</i>	
<i>у мужчин</i>	56	<i>сперматозоидов в нативном</i>	
<i>Характеристика трихомонад</i>	56	<i>препарате (кинезиограмма)</i>	74
<i>Проявления трихомоноза</i>	57	<i>Нормальная подвижность</i>	
<i>Лабораторная диагностика</i>		<i>сперматозоидов</i>	75
<i>трихомоноза</i>	58	<i>Физиологические колебания</i>	
<i>Культуральные исследования</i>	59	<i>подвижности</i>	75
<i>Герпесвирусные инфекции</i>	59	<i>Астенозооспермия</i>	75
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЯКУЛЯТА	62	<i>Инструментальные методы</i>	
Принципы исследования эякулята	62	<i>исследования подвижности</i>	
Преаналитический этап исследования		<i>сперматозоидов</i>	76
спермы	63	<i>Погрешности и трудности</i>	
<i>Подготовка пациента к проведению</i>		<i>при визуальном анализе</i>	
<i>исследования</i>	63	<i>сперматозоидов</i>	76
<i>Получение эякулята и возможные</i>		<i>Метод фотомонтажа</i>	77
<i>погрешности при этой процедуре</i>	64	<i>Методы лазерного зонда</i>	77
<i>Сбор материала</i>		<i>Фотометрия в капилляре</i>	77
<i>для исследования</i>	65	<i>Анализ качества спермы</i>	
<i>Проведение лабораторного</i>		<i>с применением автоматических</i>	
<i>исследования эякулята</i>	66	<i>анализаторов качества</i>	
<i>Погрешности лабораторного</i>		<i>спермы SQA-V</i>	77
<i>исследования эякулята</i>	66	<i>Алгоритм проведения анализа</i>	
<i>Референтные значения</i>		<i>и основные принципы работы</i>	
<i>показателей эякулята</i>	67	<i>анализатора SQA-V</i>	78
Макроскопическое исследование		<i>Основные показатели эякулята,</i>	
эякулята	68	<i>измеряемые на анализаторе</i>	
Общие свойства спермы	68	<i>SQA-V</i>	78
<i>Разжижение</i>	68	<i>Компьютерный анализ</i>	
<i>Вязкость</i>	69	<i>подвижности сперматозоидов</i>	80
<i>Объем</i>	69	<i>Устройство и принцип работы</i>	
<i>Запах</i>	69	<i>анализатора CASA</i>	81
<i>Цвет</i>	69	<i>Показатели, регистрируемые</i>	
Исследование спермы с помощью		<i>анализатором CASA</i>	82
тест-полосок	70	<i>Счетные камеры</i>	83
<i>Гемоспермия</i>	70	<i>Подогреваемый столик</i>	83
<i>Пиоспермия (лейкоспермия)</i>	70	<i>Анализ результатов технологии</i>	
<i>Реакция (рН)</i>	70	<i>CASA на примере аппаратно-</i>	
Микроскопическое исследование	71	<i>программного комплекса</i>	
Метод приготовления нативного		<i>«Видеотест-СПЕРМ»</i>	
препарата	71	<i>компании «Видео-Тест»</i>	84
<i>Предварительная оценка</i>		<i>Регистрация подвижности</i>	
<i>нативного препарата</i>	72	<i>сперматозоидов</i>	84
<i>Агглютинация</i>	72	<i>Регистрация морфологии</i>	
<i>Агрегация</i>	72	<i>сперматозоидов</i>	85
<i>Слизь</i>	72	<i>Преимущества и недостатки</i>	
<i>Липоидные тельца</i>	72	<i>видеокомпьютерного анализа</i>	86
<i>Амилоидные тельца</i>	73	Концентрация сперматозоидов	89
<i>Кристаллы спермина</i>	73	<i>Предварительная оценка</i>	
		<i>концентрации сперматозоидов</i>	89

Исследование концентрации сперматозоидов	89	Смешанная реакция агглютинации (MAR – Mixed Antiglobulin Reaction; Jager, 1978)	121
Клинические аспекты олигозооспермии	90	Тест с латексными частицами	121
Исследование морфологии сперматозоидов	91	Тест с иммунными шариками	122
Нормальные сперматозоиды	91	Непрямой тест с иммунными шариками (антиспермальные антитела)	123
Сперматозоиды в нативных и окрашенных препаратах	93	Количественные методики	123
Патологические формы сперматозоидов	94	Определение специфических антиген-антительных связей	123
Подсчет индексов множественных дефектов сперматозоидов	99	Исследование взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью ...	124
Жизнеспособность сперматозоидов	101	Получение и оценка образцов цервикальной слизи	124
Дифференциация живых и мертвых сперматозоидов	101	Процедура получения	124
Динамическое исследование эякулята	103	Хранение и консервация	125
Круглые клетки эякулята	104	Оценка свойств цервикальной слизи	125
Лейкоциты	104	Взаимодействие сперматозоидов с цервикальной слизью	126
Клетки сперматогенеза (незрелые половые клетки)	105	Тест <i>in vivo</i> (посткоитальный тест)	126
Способы окраски мазков спермы	106	Тесты <i>in vitro</i>	128
Морфология клеток в препаратах спермы, окрашенных азур-эозином	108	Биохимическое исследование спермы	129
Сперматогонии	108	Биохимические факторы, влияющие на сперматогенез	129
Сперматоциты	108	Биохимический состав эякулята	129
Сперматиды	109	Методы определения компонентов эякулята	131
Остаточные тельца	109	Методы определения концентрации фруктозы	131
Макрофаги	109	Микрометод определения концентрации фруктозы	131
Эритроциты	112	Определение концентрации лимонной кислоты	132
Эпителиальные клетки	115	Определение концентрации цинка	132
Иммунологическое исследование спермы ...	117	Определение концентрации нейтральной α -гликозидазы в семенной плазме	133
Защитные механизмы от иммунологической агрессии	117	Контроль качества исследований эякулята	134
Патогенез иммунологического бесплодия	117	Непрерывное обучение	138
Антиспермальные антитела (АСАТ) ..	118	Рекомендуемые бланки для исследования спермы и гормонов в клинико-диагностической лаборатории	139
Антиспермальные антитела у женщин	119		
Возможные механизмы повреждающего действия антиспермальных антител на фертильность	119		
Выявление антител к сперматозоидам	120		
Качественное определение АСАТ	120		
Тест Фриберга	120	БИБЛИОГРАФИЯ	141

**В.В. ДОЛГОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, Н.Д. ФАНЧЕНКО, И.И. МИРОНОВА,
Е.К. НАЗАРОВА, Н.Г. РАКОВА, С.С. РАКОВ, Т.О. СЕЛИВАНОВ, А.М. ЩЕЛОЧКОВ**

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

ООО «Издательство «Триада»
ИД № 06059 от 16.10.01 г.
170034, г. Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 504,
тел./факс (0822) 42-90-22, 35-41-30
E-mail: triada@stels.tver.ru

Подписано к печати 12.12.2006
Формат 62х94 1/8, обрезной
Бумага мелованная
Гарнитура Times New Roman. Печать офсетная
Усл. печ. л. 18,125. Тираж 3000 экз.

Заказ
Отпечатано в ООО «Тверская фабрика печати»
г. Тверь, Беляковский пер., 46