

Руководство ВОЗ

по исследованию и обработке
эякулята человека

ПЯТОЕ ИЗДАНИЕ



**World Health
Organization**



«Медико-генетический научный центр»
Российской академии медицинских наук

Руководство ВОЗ

По исследованию и обработке эякулята человека

ПЯТОЕ ИЗДАНИЕ



Всемирная организация здравоохранения



«Медико-генетический научный центр»
Российской академии медицинских наук

Издательство «КАПИТАЛ ПРИНТ»

Москва, 2012

Опубликовано Всемирной организацией здравоохранения в 2010 г. под названием WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen – 5th ed.

© Всемирная организация здравоохранения, 2010

Генеральный директор Всемирной организации здравоохранения передал права на перевод и публикацию на русском языке Федеральному государственному учреждению «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «МГНЦ» РАМН), и только ФГБУ «МГНЦ» РАМН является ответственным за издание на русском языке.

Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека
Пятое издание

ISBN 978-5-905106-09-05 (Издательство «КАПИТАЛ ПРИНТ» ЗАО)

© Всемирная организация здравоохранения, 2012

Запросы для получения разрешения на перевод или воспроизведение публикаций ВОЗ, как для продажи, так и для некоммерческого распространения, следует направлять в Отдел публикаций ВОЗ по адресу permissions@who.int

Перевод с английского к.б.н. Макарова Н. П.

Научный редактор д.б.н., проф. Курило Л. Ф.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Благодарности	xi
Список сокращений	xiii

Глава 1 Предисловие	1
1.1 Введение	1
1.2 Пятое издание	1
1.3 Обзор руководства	3

ЧАСТЬ 1 ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЯКУЛЯТА ЧЕЛОВЕКА

Глава 2 Стандартные тесты	7
2.1 Введение	7
2.2 Сбор образцов	10
2.2.1 Подготовка	10
2.2.2 Сбор эякулята для диагностических или исследовательских целей	11
2.2.3 Стерильный сбор эякулята для вспомогательных репродуктивных технологий	11
2.2.4 Стерильный сбор эякулята для микробиологического анализа	12
2.2.5 Сбор семени в домашних условиях	12
2.2.6 Сбор эякулята с помощью презерватива	12
2.2.7 Меры безопасности при работе с образцами	13
2.3 Первоначальная макроскопическая оценка эякулята	13
2.3.1 Разжижение	14
2.3.2 Вязкость эякулята	15
2.3.3 Внешний вид эякулята	15
2.3.4 Объем эякулята	16
2.3.5 pH эякулята	17
2.4 Первоначальная микроскопическая оценка эякулята	17
2.4.1 Полное смешивание и представление образца спермы	18
2.4.2 Приготовление влажного препарата	18
2.4.3 Агрегация сперматозоидов	20
2.4.4 Агглютинация сперматозоидов	20
2.4.5 Клеточные элементы, отличные от сперматозоидов	22
2.5 Подвижность сперматозоидов	22
2.5.1 Категории подвижности сперматозоидов	23
2.5.2 Подготовка и оценка образца спермы по подвижности	23
2.5.3 Примеры с решениями	27
2.5.4 Минимальное референсное значение	27
2.6 Жизнеспособность сперматозоидов	27
2.6.1 Тест на жизнеспособность с использованием окрашивания эозин-нигрозином	28
2.6.2 Тест на жизнеспособность с использованием только эозина	30
2.6.3 Тест на жизнеспособность с использованием гипосмотического набухания	31
2.7 Определение количества сперматозоидов	34
2.7.1 Типы камер для подсчета сперматозоидов	35
2.7.2 Усовершенствованный гемоцитометр Нэйбауера	35
2.7.3 Использование сетки гемоцитометра	36
2.7.4 Уход за счетной камерой	37
2.7.5 Фиксация разведенного образца спермы	38
2.7.6 Важность подсчета достаточного количества сперматозоидов	38
2.8 Рутинная процедура подсчета сперматозоидов	39
2.8.1 Определение требуемого разведения	40

2.8.2	Разведение и наполнение камеры гемоцитометра	42
2.8.3	Оценка числа сперматозоидов в расчетных камерах	43
2.8.4	Вычисление концентрации сперматозоидов в эякуляте	45
2.8.5	Примеры с решениями	45
2.8.6	Минимальное референсное значение для концентрации сперматозоидов	46
2.8.7	Вычисление общего числа сперматозоидов в эякуляте	47
2.8.8	Минимальное референсное значение общего числа сперматозоидов	47
2.9	Низкое число сперматозоидов: криптозооспермия и предполагаемая азооспермия	47
2.10	Случаи, когда не требуется точная оценка низкого числа сперматозоидов	47
2.10.1	Не производить никаких дальнейших действий	48
2.10.2	Оценка образцов спермы после центрифугирования для обнаружения сперматозоидов	48
2.10.3	Оценка нецентрифугированных образцов для обнаружения подвижных сперматозоидов	49
2.11	Случаи, когда требуется точная оценка низкой концентрации сперматозоидов	50
2.11.1	Оценка низкого числа сперматозоидов во всей усовершенствованной камере Нэйбауера (фазово-контрастная микроскопия)	50
2.11.2	Оценка низкого числа сперматозоидов на одноразовых предметных стеклах большого объема (флуоресцентная микроскопия)	54
2.12	Подсчет клеток, отличных от сперматозоидов	58
2.12.1	Вычисление концентрации округлых клеток в сперме	58
2.12.2	Чувствительность метода	58
2.12.3	Примеры с решениями	58
2.13	Морфология сперматозоидов	59
2.13.1	Понятие морфологически нормального сперматозоида	59
2.13.2	Приготовление мазков эякулята	61
2.14	Методы окрашивания	64
2.14.1	Традиционная фиксация и последующее окрашивание	65
2.14.2	Процедура окрашивания по Папаниколау для оценки морфологии сперматозоидов	66
2.14.3	Окрашивание по Шорру для оценки морфологии сперматозоидов	68
2.14.4	Процедура быстрого окрашивания для оценки морфологии сперматозоидов	69
2.15	Оценка окрашенных препаратов	70
2.15.1	Классификация морфологически нормальных сперматозоидов	70
2.15.2	Классификация морфологически аномальных сперматозоидов	72
2.16	Морфология сперматозоидов на вклейках 1–14	74
2.17	Анализ морфологии сперматозоидов на окрашенных мазках	103
2.17.1	Оценка морфологии нормального сперматозоида	103
2.17.2	Примеры с решениями	104
2.17.3	Минимальное референсное значение	105
2.17.4	Оценка морфологии аномального сперматозоида	105
2.17.5	Примеры с решениями	105
2.17.6	Оценка особых дефектов сперматозоидов	106
2.18	Оценка лейкоцитов в сперме	106
2.18.1	Окраска клеток, положительных на пероксидазу, с помощью орто-толуидина	107
2.19	Оценка незрелых половых клеток в сперме	112
2.20	Оценка антител, покрывающих сперматозоиды	112

2.20.1	Тест на смешанную антиглобулиновую реакцию (MAR-тест)	113
2.20.2	Прямой тест с иммунными шариками	115
2.20.3	Непрямой тест с иммунными шариками	118
Глава 3 Дополнительные тесты		120
3.1	Индексы множественных дефектов сперматозоидов	120
3.1.1	Подсчет индексов множественных дефектов сперматозоидов	120
3.1.2	Примеры с решениями	122
3.2	Панлейкоцит (CD45). Иммуноцитохимическое окрашивание (CD45)	122
3.2.1	Принцип	123
3.2.2	Реагенты	123
3.2.3	Процедура	123
3.3	Оценка взаимодействия сперматозоидов и цервикальной слизи	127
3.3.1	Тест in vivo (посткоитальный тест)	127
3.3.2	Тесты in vitro	130
3.3.3	Упрощенный in vitro тест на предметном стекле	131
3.3.4	Тест с капиллярными трубочками	133
3.4	Биохимический анализ функции придаточных половых желез	135
3.4.1	Определение цинка в семенной жидкости	136
3.4.2	Оценка фруктозы в семенной плазме	138
3.4.3	Измерение нейтральной а-глюкозидазы в семенной плазме	140
3.5	Компьютерный анализ эякулята	143
3.5.1	Введение	143
3.5.2	Использование CASA для оценки подвижности сперматозоидов	144
3.5.3	Использование CASA для оценки концентрации сперматозоидов	146
3.5.4	Компьютерная оценка морфологии сперматозоидов	147
Глава 4 Научные тесты		149
4.1	Оценка свободных радикалов	149
4.1.1	Введение	149
4.1.2	Оценка свободных радикалов, продуцируемых в сперме	150
4.2	Оценка взаимодействия сперматозоидов с ооцитом человека	153
4.3	Оценка связывания сперматозоидов с зоной пеллюцида человека	154
4.4	Оценка акросомной реакции	154
4.4.1	Процедура флуоресцентной оценки акросомного статуса	155
4.4.2	Оценка индуцированной акросомной реакции	157
4.5	Тест с ооцитами хомячка, лишенными зоны пеллюцида	159
4.5.1	Протокол	160
4.6	Оценка хроматина сперматозоидов	164
ЧАСТЬ 2 ОБРАБОТКА ЭЯКУЛЯТА ЧЕЛОВЕКА		
Глава 5 Методы обработки эякулята		169
5.1	Введение	169
5.1.1	Случаи, когда сперматозоиды необходимо выделить из семенной жидкости	169
5.1.2	Выбор метода обработки эякулята	170
5.1.3	Эффективность отделения сперматозоидов от семенной жидкости и инфекционных организмов	170
5.2	Общие принципы	171
5.3	Простое отмывание	171
5.3.1	Реагенты	171
5.3.2	Процедура	172
5.4	Прямой метод swim-up	172
5.4.1	Реагенты	173
5.4.2	Процедура	173
5.5	Градиент плотностей	173

5.5.1	Реагенты	174
5.5.2	Процедура	175
5.6	Работа с ВИЧ-инфицированными образцами эякулята	175
5.7	Обработка тестикулярных и эпидидимальных сперматозоидов	175
5.7.1	Ферментный метод	176
5.7.2	Механический метод	176
5.7.3	Обработка суспензии сперматозоидов для интрацитоплазматической инъекции (ИКСИ)	176
5.8	Обработка спермы при ретроградной эякуляции	177
5.9	Обработка спермы, полученной путем вспомогательной эякуляции	177
Глава 6 Криоконсервация сперматозоидов		178
6.1	Введение	178
6.2	Протоколы криоконсервации спермы	181
6.2.1	Стандартная процедура	182
6.2.2	Модифицированный протокол замораживания для образцов с олигозооспермией и для хирургически полученных сперматозоидов	185
6.2.3	Маркировка соломин и ведение записей	185

ЧАСТЬ 3 ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА

Глава 7 Обеспечение и контроль качества		189
7.1	Контроль качества в андрологической лаборатории	189
7.2	Природа ошибок при анализе эякулята	189
7.3	Минимизация статистической ошибки выборки	190
7.4	Программа обеспечения качества	193
7.5	Прописи стандартных лабораторных процедур	194
7.6	Внутренний контроль качества	194
7.6.1	Покупка образцов для контроля качества	194
7.6.2	Образцы, приготовленные в лаборатории	195
7.6.3	Хранящиеся образцы эякулята для контроля качества (приготовленные промышленно или в лаборатории)	195
7.6.4	Нативные образцы эякулята для контроля качества (приготовленные в лаборатории)	196
7.7	Статистические процедуры оценки систематических различий результатов, полученных одним и тем же лаборантом и разными лаборантами	197
7.7.1	График \bar{X}	197
7.7.2	График S	200
7.8	Процедуры контроля качества для процентных значений	201
7.9	Оценка графиков \bar{X} и S	201
7.9.1	Как обнаружить значения, лежащие вне контрольных границ	202
7.9.2	Причины появления значения вне контрольных границ	203
7.9.3	Реакция на значения вне контрольных	203
7.10	Статистические процедуры оценки вариабельности результатов, полученных одним и разными лаборантами	204
7.10.1	Сравнение результатов от двух и более лаборантов	204
7.10.2	Ежемесячный мониторинг средних значений	206
7.11	Внешний контроль качества и процедуры обеспечения качества	207
7.11.1	Оценка результатов внешнего контроля качества	209
7.11.2	Отношение к результатам, выходящим за рамки контрольных значений	210
7.12	Частота и приоритетность процедур контроля качества	210
7.13	Обучение	212

7.13.1	Практические советы при трудностях с оценкой концентрации сперматозоидов	212
7.13.2	Практические советы при трудностях оценки морфологии сперматозоидов	214
7.13.3	Практические советы при трудностях оценки подвижности сперматозоидов	215
7.13.4	Практические советы при трудностях оценки жизнеспособности сперматозоидов	217

ЛИТЕРАТУРА **221**

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1 Нормативные значения и классификация показателей эякулята **239**

A1.1	Нормативные значения	239
A1.2	Классификация	241

Приложение 2 Оборудование и безопасность **243**

A2.1	Оснащение андрологической лаборатории	243
A2.2	Потенциальные риски в андрологической лаборатории	246
A2.3	Безопасность лабораторного персонала	246
A2.4	Безопасность лабораторного оборудования	248
A2.5	Безопасность и меры предосторожности при работе с жидким азотом	249

Приложение 3 Микроскопия **251**

A3.1	Размещение образца	252
A3.2	Настройка окуляров	254
A3.3	Фокусировка изображения	254
A3.4	Фокусировка окуляров	254
A3.5	Фокусировка светового конденсора	254
A3.6	Центрирование конденсора	255
A3.7	Регулировка фазовых колец	255
A3.8	Флуоресцентная микроскопия	256

Приложение 4 Приготовление основных растворов **257**

A4.1	Раствор BWW (Biggers, Whitten, Whittingham)	257
A4.2	Фосфатно-солевой буфер Дульбекко (PBS)	257
A4.3	Среда Эрла	258
A4.4	Среда F-10 (Ham's F-10 medium)	258
A4.5	Сбалансированный солевой раствор Хэнкса	259
A4.6	Трубная жидкость человека	259
A4.7	Среда Кребса — Рингера	259
A4.8	Трибуферная соль (TBS)	260
A4.9	Раствор Тироде	260
A4.10	Окраска по Папаниколау	260

Приложение 5 Цервикальная слизь **264**

A5.1	Введение	264
A5.2	Получение и консервация образцов цервикальной слизи	265
A5.3	Оценка цервикальной слизи	266

Приложение 6 Формы для записи результатов анализа эякулята и цервикальной слизи **270**

A6.1	Образец формы для записи результатов семиологического анализа	270
A6.2	Образец формы для записи свойств цервикальной слизи	272

Приложение 7 Ошибки расчета и контроль качества	273
A7.1 Ошибки при расчете концентрации сперматозоидов	273
A7.2 Важность понимания ошибок подсчета	275
A7.3 Ошибки при измерении процентных значений	276
A7.4 Приготовление образцов эякулята для контроля качества	279
A7.5 Создание видеозаписи для контроля качества при анализе подвижности сперматозоидов	280
A7.6 Приготовление разбавленного эякулята для контроля качества при определении концентрации сперматозоидов	284
A7.7 Приготовление предметных стекол для внутреннего контроля качества при оценке морфологии сперматозоидов	287
A7.8 Калибровка оборудования	289

Приложение 8 Национальные программы внешнего контроля качества семиологического анализа	291
--	------------

РИСУНКИ

Рис. 2.1 Вариации общего числа сперматозоидов и их концентрации на протяжении 1,5-годового периода.	9
Рис. 2.2 Неспецифическая агрегация сперматозоидов в эякуляте	20
Рис. 2.3 Схематическое отображение различных типов агглютинации сперматозоидов	21
Рис. 2.4 Вспомогательные инструменты для оценки подвижности сперматозоидов	25
Рис. 2.5 Мазок, окрашенный эозин-нигрозином, в световом микроскопе	29
Рис. 2.6 Схематическое изображение типичных морфологических изменений сперматозоида человека при гипоосмотическом стрессе	33
Рис. 2.7 Усовершенствованный гемоцитометр Нэйбауера	36
Рис. 2.8 Сперматозоиды для расчета в квадратах	37
Рис. 2.9 Изучение по всему покровному стеклу на присутствие подвижных сперматозоидов	50
Рис. 2.10 Морфология «нормального» сперматозоида	60
Рис. 2.11 Методы приготовления мазков эякулята для оценки морфологии сперматозоидов	62
Рис. 2.12 Приготовление мазка эякулята с нормальной вязкостью	63
Рис. 2.13 Схематическое изображение некоторых патологических форм сперматозоидов человека	73
Рис. 2.14 Пероксидаза — положительные и — отрицательные клетки в сперме человека	109
Рис. 3.1 Лейкоциты в эякуляте	126
Рис. 3.2 Измеритель Кремера пенетрационных возможностей спермы	134
Рис. 3.3 Стандартные переменные, измеряемые с помощью системы CASA	146
Рис. 4.1 Хемилюминесценция, возникающая в ответ на обработку опсонизированным зимосаном	152
Рис. 4.2 Относительный вклад субпопуляций лейкоцитов и сперматозоидов в генерацию свободных радикалов в суспензии спермы	153
Рис. 4.3 Показаны сперматозоиды, окрашенные флуоресцентным агглютинином <i>Pisum sativum</i> (PSA)	157
Рис. 4.4 Фазово-контрастная микрофотография ооцита хомячка без зоны пеллюцида, содержащего сперматозоиды человека	165
Рис. 7.1 График Xbar для концентрации сперматозоидов	199
Рис. 7.2 График S для концентрации сперматозоидов	201
Рис. 7.3 График Блэнда-Альтмана для результатов оценок процента прогрессивно подвижных сперматозоидов, выполненных лаборантом и системой CASA	204

Рис. 7.4	График Юдена для оценки концентрации сперматозоидов	205
Рис. А2.1	Номограмма (расчетный график) для определения относительной центростремительной силы, исходя из радиуса ротора и скорости вращения	247
Рис. А5.1	Примеры феномена папоротника, образующегося в цервикальной слизи, нанесенной на предметное стекло и высушенного на воздухе	265
Рис. А7.1	Приемлемые различия между двумя повторными подсчетами как функция общего числа оцененных сперматозоидов	274
Рис. А7.2	Приемлемые различия между двумя повторными оценками как функция истинного процента и общего числа оцененных сперматозоидов	277
Рис. А7.3	Техника движения при оценке подвижности сперматозоидов	283
Рис. А7.4	Вид через окуляр с сеткой (красный квадрат)	283
Рис. А7.5	Вид микрометра предметного столика на мониторе и нарисованная сетка, см. текст для объяснения	284

БОКСЫ

Бокс 2.1	Подтверждение возможности сбора образца семени в контейнер	11
Бокс 2.2	Приготовление бромелайна	15
Бокс 2.3	Тщательное перемешивание эякулята	18
Бокс 2.4	Глубина влажного препарата	19
Бокс 2.5	Ошибки при оценке процентных значений	26
Бокс 2.6	Сравнение процентных значений, полученных при повторении расчетов	26
Бокс 2.7	Стандартная ошибка при оценке концентрации сперматозоидов	38
Бокс 2.8	Достижение подсчета 200 сперматозоидов на повтор в центральных трех квадратах усовершенствованного гемоцитометра Нэйбауера	39
Бокс 2.9	Объем спермы, наблюдаемый на поле зрения при микроскопии с высоким разрешением (МВР) при оценке влажного препарата глубиной 20 мкм	40
Бокс 2.10	Сравнение повторных подсчетов	44
Бокс 2.11	Достижение 200 сперматозоидов при расчете во всех девяти квадратах усовершенствованной камеры Нэйбауера	51
Бокс 2.12	Достижение подсчета 200 сперматозоидов на повтор в камере глубиной 100 мкм, одноразовой камере большого объема	54
Бокс 2.13	Расчет наблюдаемого объема поля зрения в камере глубиной 100 мкм	56
Бокс 2.14	Среда для заключения препаратов	66
Бокс 3.1	Приготовление смеси воск-вазелин	128
Бокс 3.2	Наблюдаемый объем на поле зрения при высоком увеличении на препарате цервикальной слизи глубиной 100 мкм	129
Бокс 4.1	Индукция овуляции у хомячков	161
Бокс 4.2	Приготовление стеклянных пипеток	163
Бокс 6.1	Причины криоконсервации сперматозоидов	179
Бокс 6.2	Оценка риска криоконсервации и хранения спермы человека	180
Бокс 7.1	Некоторые термины программ обеспечения и контроля качества	190
Бокс 7.2	Определение предупредительных и действительных границ для графика \bar{X} bar	198
Бокс 7.3	Альтернативный способ вычисления контрольных границ для \bar{X} bar с помощью совокупного стандартного отклонения	199
Бокс 7.4	Определение предупредительных и действительных контрольных границ для графика S	200
Бокс 7.5	Основные правила контроля для графиков КК	202
Бокс 7.6	Оценка систематических расхождений по результатам между лаборантами	207
Бокс 7.7	Основные особенности процедур внутреннего контроля качества	209

Бокс 7.8	Расписание процедур контроля качества	211
Бокс 7.9	Обзор методов контроля качества	211
Бокс А2.1	Вычисление силы центрифугирования	246
Бокс А3.1	Объективы	252
Бокс А5.1	Определение объема цервикальной слизи	267
Бокс А5.2	Наблюдаемый объем при микроскопии с высоким разрешением на препарате глубиной 100 мкм	268

ТАБЛИЦЫ

Таблица 2.1	Приемлемые различия между двумя процентными значениями средних, определенных из двойного расчета 200 сперматозоидов (всего 400 подсчитанных сперматозоидов)	26
Таблица 2.2	Округленные значения стандартной ошибки (%) согласно общему числу подсчитанных сперматозоидов	39
Таблица 2.3	Требуемые разведения спермы, исходя из используемой камеры и оцениваемого поля зрения	41
Таблица 2.4	Приемлемые различия суммы, полученной двумя последовательными подсчетами	44
Таблица 2.5	Приемлемые различия между двумя расчетами полученной суммы: низкая концентрация сперматозоидов	52
Таблица 2.6	Сокращения, используемые в комментариях к вклейкам по морфологии 1–14	74
Таблица 2.7	Количество спермы, необходимое для проведения теста с иммунными шариками	116
Таблица 3.1	Подсчет индексов множественных дефектов сперматозоидов	121
Таблица 3.2	Индекс деформированности сперматозоидов (SDI), рассчитанный у мужчин в фертильных и бесплодных парах	122
Таблица 3.3	Определение ранга плотности пенетрации сперматозоидов	134
Таблица 3.4	Классификация результатов теста с капиллярными трубочками	135
Таблица 7.1	Коэффициенты контрольных пределов для графиков \bar{X} и S на основе среднего стандартного отклонения (S_{bar})	198
Таблица 7.2	Источники вариаций (ошибок) при оценке концентрации сперматозоидов и возможные решения	212
Таблица 7.3	Источники вариаций (ошибок) при оценке морфологии сперматозоидов и возможные решения	214
Таблица 7.4	Источники вариаций (ошибок) при оценке подвижности сперматозоидов и возможные решения	216
Таблица 7.5	Источники вариаций (ошибок) при оценке жизнеспособности сперматозоидов и возможные решения	217
Таблица А1.1	Минимальные референсные значения показателей эякулята (5-й перцентиль и 95%-й доверительный интервал)	240
Таблица А1.2	Распределение значения показателей эякулята мужчин, чьи половые партнерши забеременели в течение 12 мес. после прекращения предохранения	241
Таблица А1.3	Классификация показателей эякулята	242
Таблица А7.1	Приемлемые различия между двумя повторными подсчетами, исходя из полученной суммы значений	274
Таблица А.7.2	Приемлемые различия между двумя процентными значениями, исходя из полученного среднего значения при повторных расчетах 100 сперматозоидов (суммарно 200 сперматозоидов)	278
Таблица А.7.3	Приемлемые различия между двумя процентными значениями, исходя из полученного среднего значения при повторных расчетах 200 сперматозоидов (суммарно 400 сперматозоидов)	278
Таблица А7.4	Приемлемые различия между двумя процентными значениями, исходя из полученного среднего значения при повторных расчетах 400 сперматозоидов (суммарно 800 сперматозоидов)	279

Благодарности

Данная публикация была выполнена благодаря специальной программе UNDP/UNFPA/ВОЗ/Мирового банка по исследованию, развитию и подготовке специалистов в области репродукции человека (HRP), Департаменту репродуктивного здоровья и исследований ВОЗ (RHR). Выражаем признательность за участие в подготовке и редактировании данного Руководства следующим ученым:

Главный редактор

Dr Trevor G Cooper

Centre of Reproductive Medicine and Andrology of the University, Mьnster, Germany (WHO Collaborating Centre for Research in Male Reproduction)

Редакционная коллегия

Dr John Aitken

Biological Sciences
School of Life and Environmental Sciences
University Drive
Callaghan, New South Wales, Australia

Dr Jacques Auger

Service de Biologie de la Rйproduction
Pavillon Cassini Hьpital Cochin
Paris, France

Dr HW Gordon Baker

University of Melbourne
Department of Obstetrics and Gynaecology
Royal Women's Hospital
Carlton, Victoria, Australia

Dr Chris LR Barratt

Division of Maternal and Child Health Sciences
The Medical School
Ninewells Hospital
Dundee, Scotland

Dr Hermann M Behre

Centre for Reproductive Medicine and Andrology
Martin-Luther-University
Halle, Germany

Dr Lars Björndahl

Andrology Centre,
Karolinska University Hospital and Institute,
Stockholm, Sweden

Ms Charlene Brazil

Center for Health and the Environment
University of California
Davis, CA, USA

Dr Christopher De Jonge

University of Minnesota
Reproductive Medicine Center
Minneapolis, MN, USA

Dr Gustavo F Doncel

CONRAD
Department of Obstetrics and Gynecology Eastern Virginia
Medical School
Norfolk, VA, USA

Dr Daniel Franken

Department of Obstetrics and Gynaecology
Tygerberg Hospital
Tygerberg, South Africa

Dr Trine B Haugen

Faculty of Health Sciences
Oslo University College
Oslo, Norway

Dr Aucky Hinting

Andrology Unit,
Department of Biomedicine
School of Medicine
Airlangga University,
Surabaya, Indonesia

Mr Godwin E Imade

Department of Obstetrics and Gynaecology
Faculty of Medical Sciences University
of Jos
Jos, Nigeria

Dr Thinus F Kruger

Reproductive Biology Unit
Stellenbosch University
Tygerberg, South Africa

Dr Hesbon O Odongo

Department of Zoology
University of Nairobi
Nairobi, Kenya

Ms Elizabeth Noonan

Fred Hutchinson Cancer Research Center
Statistical Center for HIV/AIDS Research
and Prevention
Seattle, WA, USA

Dr Steven M Schrader

National Institute for Occupational
Safety and Health
Centers for Disease Control and Prevention
Cincinnati, OH, USA

Dr Christina CL Wang

Harbor-UCLA Medical Center
Torrance, CA, USA

Dr William Shu-Biu Yeung

Department of Obstetrics and Gynaecology
University of Hong Kong
Hong Kong SAR, China

**Секретариат ВОЗ,
Департамент репродуктивного
здоровья и исследований**

Dr Kirsten M Vogelsong

Scientist
Research Area Manager

Dr Sigrid von Eckardstein

Former Acting Research Area Manager

Dr Michael T Mbizvo

Director ad interim

Ms Maud Keizer

Secretary

Также выражаем благодарность:

Cathy Treece, Charlene Tollner и профессору Jim Overstreet (Университет Калифорнии, США) за предоставление микрофотографий сперматозоидов для оценки морфологии и контрольной среды;
доктору Rune Eliasson (клиника Hospital, Стокгольм, Швеция) за помощь в оценке неспермальных клеток;
доктору Timothy Farley (ВОЗ, Женева, Швейцария) за обзор Раздела, посвященного контролю качества,
доктору Roelof Menkveld (Tygerberg Academic Hospital и University of Stellenbosch, Tygerberg, Южная Африка);
и доктору Gary N Clarke (The Royal Women's Hospital, Карлтон, Австралия) и профессору Pieter Wranz (University of Stellenbosch, Tygerberg, Южная Африка) за дополнительную информацию, используемую в Руководстве.

Благодарим Международное сообщество андрологии за финансовую поддержку.

Данное издание Руководства посвящается памяти покойного Geoffrey Waites (1928–2005), бывшего руководителя экспертной группы ВОЗ по методам оценки мужского бесплодия и одного из редакторов второго, третьего и четвертого изданий данного Руководства. Преданность редакционного комитета данной задаче обусловлена честностью, справедливостью и заботой об обездоленных Джеффри

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ab	Антитело
AI	Искусственная инсеминация
AID	Искусственная инсеминация спермой донора
AIH	Искусственная инсеминация спермой мужа
ALH	Амплитуда латерального смещения головки сперматозоида
ANOVA	Анализ вариаций
APAAP	Комплекс щелочная фосфатаза — антищелочная фосфатаза
AR	Прореагировавшая акросома
ART	Вспомогательные репродуктивные технологии
ASA	Антиспермальные антитела
BAEE	N-бензол-L-аргинин этил эфир
BCF	Частота перекрестного биения (Гц)
BSA	Бычий сывороточный альбумин
BWW	Biggers, Whitten и Whittingham
CASA	Компьютерный сперманализатор
CASMA	Компьютерная морфометрия сперматозоидов
CBAVD	Конгенитальное билатеральное отсутствие vas deferens
CD	Компактный диск
CD	Цитоплазматическая капля
CD45	Кластер определения 45 (маркер лейкоцитов)
CD46	Кластер определения 46 (акросомный антиген)
CI	Доверительный интервал
CL	Доверительные пределы
CO ₂	Углекислый газ
DMSO	Диметил сульфоксид
DNA	ДНК
DPBS	Фосфатный буфер Дульбекко
DVD	Диск DVD
EDTA	Этиленамин тетрауксусная кислота
EQC	Внешний контроль качества
ERC	Чрезмерная резидуальная цитоплазма
FITC	Флуоресцентный изотиоцианат
FMLP	Формил-метионин-лейцин-фенилаланин
GIFT	Перенос гамет в фаллопиевы трубы
GPC	Глицерофосфохолин
H ₂ O ₂	Пироксид водорода
HBSS	Сбалансированный солевой раствор Хэнкса
HBV	Вирус гепатита В
hCG	Хорионический гонадотропин человека
HCV	Вирус гепатита С
HIV	Вирус иммунодефицита человека
HOP	Пенетрация ооцита хомячка
HOS	Тест на гипоосмотическое набухание
HPF	Поле высокого разрешения
HRP	Пероксидаза хрена
HSA	Сывороточный альбумин человека
HTF	Трубная жидкость человека
IB	Иммунные шарики
IBT	Тест с иммунными шариками
ICSI	Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит человека
Ig	Иммуноглобулин
IM	Неподвижные сперматозоиды
IQC	Внутренний контроль качества

IU	Международная единица
IUI	Внутриматочная инсеминация
IVF	Экстракорпоральное оплодотворение
KRM	Среда Кребса-Рингера
LIN	Линейность
LLQ	Нижний предел квантования
LPF	Поле низкого разрешения
MAD	Среднее угловое смещение
MAI	Индекс множественных аномалий
MAR	Смешанная антиглобулиновая реакция
NA	Числовая апертура
NP	Непрогрессивная подвижность
PBS	Фосфатно-буферная соль
PDCA	Планируй, делай, проверяй, исправляй
PMA	Форбол 12-миристанат 13-ацетат
PMSG	Сывороточный гонадотропин беременных кобыл
PNPG	<i>p</i> -Нитрофенол глюкопиранозада
PR	Прогрессивная подвижность
PSA	Агглютинин <i>Pisum sativum</i>
QA	Обеспечение качества
QC	Контроль качества
RCF	Относительная сила центрифугирования
RI	Индекс рефракции
RNA	РНК
ROS	Свободные радикалы кислорода
r.p.m.	Обороты в минуту
SD	Стандартное отклонение
SDI	Индекс деформированности сперматозоидов
SDS	Соль додецилсульфата
SE	Стандартная ошибка
SOP	Стандартная процедура
STR	Прямолинейность (VSL/VAP)
TBS	Трис-буферная соль
TGG	Раствор Тироде
TZI	Индекс тератозооспермии
VAP	Средняя скорость пути
VCL	Криволинейная скорость
VSL	Прямолинейная скорость
WHO	Всемирная организация здравоохранения
WOB	Колебание (VAP/VCL)

Список дополнительных сокращений и обозначений (в русском издании):

ACAT	Антиспермальные антитела
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
BPT	Вспомогательные репродуктивные технологии
DMCO	Диметилсульфоксид
ИКСИ	Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит
КК	Контроль качества
МВР	Микроскопия с высоким разрешением
ХГЧ	Хорионический гонадотропин человека
ЧСА	Сывороточный альбумин человека
ЭКО	Экстракорпоральное оплодотворение

ГЛАВА 1 Предисловие

1.1 Введение

Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью было впервые опубликовано в 1980 году в ответ на все возрастающую потребность в стандартизации методов исследования эякулята человека.

С тех пор оно обновлялось три раза и было переведено на несколько языков. За прошедшие 30 лет Руководство расценивали как всемирный стандарт, его широко использовали исследовательские и клинические лаборатории по всему миру.

Несмотря на успех, стало понятно, что некоторые рекомендации из предыдущих изданий Руководства необходимо пересмотреть в свете современных данных, а некоторые концепции нуждаются в большем разъяснении и основании. Следуя этим соображениям, ВОЗ учредил редакционный совет для пересмотра всех методов, описанных в Руководстве, на предмет их актуальности и применимости. Во многих случаях это относительно трудно сделать из-за недостаточности имеющихся данных с использованием методов, описанных в Руководстве. В некоторых случаях одна аккредитованная лаборатория получила непротиворечивые данные, однако другие не подтвердили ее данные.

Для таких ситуаций редакционный совет после анализа

соответствующей литературы разработал консенсусную позицию.

Для получения большей информации по многим методам описаны дополнительные рекомендации, полученные от лабораторных работников и ученых. Отсутствие деталей в предыдущих изданиях предполагало, что некоторые лаборатории предпочитают использовать другие методы либо разработали свои собственные протоколы выполнения семиологического анализа. Для упрощения сравнения полученных результатов данное Руководство включает более подробную информацию о методах проведения анализа, а когда присутствует альтернативный метод проведения анализа, приведено разумное обоснование его включения. Когда в научных статьях публикуются результаты, при ссылке на данное руководство ВОЗ лабораториям следует указывать, какие альтернативные методы были использованы.

1.2 Пятое издание

Пятое издание состоит из трех частей: семиологический анализ (главы 2–4), методы обработки спермы (главы 5 и 6) и контроль качества (глава 7). Часть 1, описывающая проведение семиологического анализа, подобна соответствующим главам в предыдущих изданиях, но здесь она поделена на три главы: стандартные процедуры, которые являются рутинными методами по определению качества спермы; дополнительные тесты, которые используются в определенных ситуациях либо по выбору лаборатории; и научные тесты, которые в настоящее время не признаны рутинными. Так как культивирование эякулята обычно не проводят в андрологической лаборатории, о стерильном сборе спермы указано только в соответствующем разделе. В разделе

о методах приготовления спермы приведено описание как работы с эякулятом, так и со сперматозоидами, полученными из яичек и эпидидимиса. Дополнительные пояснения к методическим инструкциям перечислены под пометками «Важно» (пояснения к методу), «Комментарии» (интерпретация результатов) и «Боксы» (содержат дополнительный разъяснительный материал).

Главные особенности пятого издания перечислены ниже.

- Главы о семиологическом анализе включают описание всех рабочих растворов, процедур, расчетов и интерпретаций так, чтобы информация о применяемом методе была полной, с минимальными перекрестными ссылками на другие части Руководства.
- Раздел о подготовке спермы расширен и добавлена глава о криоконсервации сперматозоидов. Процедуры, связанные с анализом цервикальной жидкости, поделены между главой «Дополнительные тесты» и приложением о характеристиках цервикальной слизи.
- Добавлено несколько приложений по сравнению с предыдущими изданиями, они содержат узко специализированную или редко используемую информацию.
- *Оценка числа сперматозоидов.* Разведение спермы и области расчетных камер, используемые для оценки числа сперматозоидов в образце спермы, меняются для того, чтобы оценить 200 сперматозоидов на один расчет. Подчеркивается важность ошибки измерения и полученный численный результат. Редакторский совет считает, что суммарное количество сперматозоидов в эякуляте дает более точную оценку тестикулярной функции, чем концентрация сперматозоидов, но при точно измеренном объеме эякулята.
- *Оценка азооспермии.* Несмотря на внешний вид образца, при постановке диагноза азооспермия не учитывают множество факторов, включая ошибки, связанные с подсчетом небольшого числа сперматозоидов, большого числа анализируемых полей зрения и трудности в оценке осадка эякулята, содержащего клеточный дебрис. Рекомендовано включить оценку зафиксированных образцов без центрифугирования и указывать чувствительность используемого метода расчета. При этом также *следует* включать методы с центрифугированием, необходимые для оценки достаточного числа клеток при клинических оценках и методы определения подвижных сперматозоидов в нативных препаратах для оценки спермы после вазэктомии.
- *Оценка подвижности сперматозоидов.* Основное изменение по сравнению с предыдущими изданиями заключается в категоризации сперматозоидов по подвижности. Здесь рекомендовано распределять сперматозоиды на следующие категории: прогрессивно подвижные, непрогрессивно подвижные и неподвижные (вместо категорий a, b, c и d).
- *Оценка морфологии сперматозоидов.* Некоторые лаборатории оценивают только морфологически нормальные формы, при этом другие

оценивают тип, локализацию и степень аномальности, что более важно. Увеличивают ли эти или другие полуколичественные методы оценки значение семиологического анализа, остается спорным. Очевидность поддержания соотношения между процентом нормальных форм (согласно строгим критериям или оценке морфологии CASA) и процентом оплодотворения *in vivo* подтверждают попытки определить морфологически нормальную субпопуляцию сперматозоидов в сперме. В данное издание включено большее число и лучшего качества микрофотографий сперматозоидов, демонстрирующих нормальные и пограничные формы, приводятся пояснения, почему каждый сперматозоид отнесен к той или иной категории. Это поможет специалистам научиться распределять сперматозоиды по категориям. Недавние данные о фертильной популяции позволили определить референсные значения содержания морфологически нормальных форм сперматозоидов в сперме.

- *Контроль качества.* Данная глава полностью переписана. Необходим строгий контроль качества семиологического анализа с помощью серьезных аналитических методов. Для повышения качества лабораторной деятельности приведены советы и описание возможных ошибок, в случаях неудовлетворительного контроля качества.
- *Референсные диапазоны и минимальные референсные значения.* Данные, характеризующие качество спермы фертильных мужчин, чьи партнерши оказались беременными в течение 12 месяцев после окончания предохранения, дают диапазон референсных значений в данном руководстве. Необработанные данные, полученные на 400–1900 образцах спермы мужчин, недавно ставших отцами в восьми странах на трех континентах, были положены в основу референсного диапазона. Статистическая традиция использовать 2,5-й перцентиль при двухстороннем референсном интервале как порога оцениваемой величины верна для разнородной популяции. Однако односторонний референсный интервал, как показано, в большей степени подходит для описания показателей эякулята, так как высокие значения любого параметра, вероятно, не вызывают нарушение фертильности. 5-й перцентиль предложен в качестве минимального референсного значения, а все показатели эякулята также приведены в Приложении 1.

1.3 Обзор руководства

Методы, описанные здесь, предназначены как рекомендации для улучшения качества проведения семиологического анализа и сравнения полученных результатов. Их не следует в обязательном порядке утверждать как стандарт для местных, национальных или мировых лабораторных учреждений. Проведение анализа эякулята может быть полезно как для клинических, так и исследовательских целей, для изучения фертильного статуса мужчин, а также для мониторинга сперматогенеза во время лечения.

ЧАСТЬ 1

Исследование эякулята человека

ГЛАВА 2 Стандартные тесты

2.1 Введение

Во время семяизвержения концентрированная суспензия сперматозоидов, хранящаяся в эпидидимисе, смешивается и разжижается с помощью жидкости желез дополнительной секреции мужского полового тракта. Эякулят подразделяют на несколько фракций. Сравнения объема эякулята из пре- и постсемявыносящего протока показали, что около 90% объема эякулята составляет секрет желез дополнительной секреции (Weiske, 1994), в основном простаты и семенных пузырьков, меньший вклад вносят луковично-уретральные железы (Куперовы) и эпидидимис. Семиологическая жидкость имеет два основных количественных показателя:

- общее количество сперматозоидов: оно отражает продукцию сперматозоидов яичками и потенцию посттестиккулярной канальцевой системы;
- общий объем эякулята, состоящий из выделений желез дополнительной секреции: параметр отражает секреторную активность желез.

Качество сперматозоидов (их жизнеспособность, подвижность и морфология) и состав семенной жидкости также являются важными факторами для сперматологической функции.

Во время сексуального контакта первичная, богатая сперматозоидами фракция эякулята вступает в контакт с цервикальной слизью, находящейся во влагалище (Sobrero & MacLeod, 1962), другая фракция остается во влагалище в виде свободной жидкости. В отличие от естественных условий, в лаборатории весь эякулят собирают в один контейнер, где сперматозоиды формируют коагулят с протеинами семенных пузырьков. Этот коагулят затем разжижается под действием протеаз простаты, при этом осмолярность возрастает (Björndahl & Kvist, 2003; Cooper et al., 2005). Получены некоторые свидетельства тому, что качество образцов семени варьирует в зависимости от того, как эякулят был собран. Эякулят, собранный посредством мастурбации в контейнер в специальной комнате близ лаборатории, может иметь более низкое качество по сравнению с эякулятом, полученным в неспермицидный презерватив по время коитуса в домашних условиях (Zavos & Goodpasture, 1989). Это различие может отражать различные формы сексуального возбуждения, так как время, потраченное на сбор образца семени посредством мастурбации — промежуток времени до эякуляции — также влияет на качество эякулята (Pound et al., 2002).

Несмотря на условия сбора семени, качество эякулята зависит от факторов, которые обычно не могут быть изменены, такие как продукция сперматозоидов яичками, секрет желез и недавно перенесенное заболевание (особенно лихорадка), а также другие факторы, такие как время воздержания, которые следует записывать и принимать во внимание при интерпретации результатов.

Результаты расчета качества эякулята в лаборатории будут зависеть от следующих параметров.

- Собран ли полностью весь эякулят. Во время семяизвержения первая фракция семени в основном богата сперматозоидами с секретом предстательной железы, при этом последующие фракции представляют собой секрет семенных пузырьков (Björndahl & Kvist, 2003). Именно поэтому потеря первой (богатой сперматозоидами) порции эякулята наиболее влияет на результаты семиологического анализа, чем потеря последующей порции.
- Активность желез дополнительной секреции; жидкости, которые разбавляют концентрированные эпидидимальные сперматозоиды при семяизвержении (Eliasson, 2003). Концентрация сперматозоидов напрямую не связана с возможностью продукции половых клеток яичками, так как на нее влияют функциональные возможности других репродуктивных органов; однако общий объем эякулируемых сперматозоидов (концентрация сперматозоидов, умноженная на объем эякулята) связан с яичками. Например, концентрация сперматозоидов в эякуляте молодых и пожилых мужчин может быть одна и та же, но общее количество сперматозоидов может отличаться, так как и объем семиологической жидкости, и общее количество производимых сперматозоидов снижаются с возрастом, по крайней мере, в некоторых популяциях (Ng et al., 2004).
- Время от последней сексуальной активности. При отсутствии эякуляции сперматозоиды накапливаются в эпидидимисе, затем избыток клеток попадает в уретру и вымывается вместе с мочой (Cooper et al., 1993; De Jonge et al., 2004). Увеличение времени абстиненции не отражается на жизнеспособности сперматозоидов и состоянии хроматина (Tyler et al., 1982b; De Jonge et al., 2004), при этом нарушается функция эпидидимиса (Correa-Perez et al., 2004).
- Предпоследний период абстиненции. Так как эпидидимис не полностью опустошается при одной эякуляции (Cooper et al., 1993), некоторые сперматозоиды остаются со времени последней эякуляции. Это влияет на старение и качество сперматозоидов в эякуляте (Tyler et al., 1982a). Степень этого влияния трудно установить и его редко принимают в расчет.
- Размер яичек влияет на общее число сперматозоидов в эякуляте (Handelsman et al., 1984; WHO, 1987; Behre et al., 2000; Andersen et al., 2000). Тестикулярный объем отражает уровень сперматогенной активности, который также влияет на морфологию сперматозоидов (Holstein et al., 2003).

Комментарий: Наибольшие биологические вариации качества семени (Castilla et al., 2006) отражают многие факторы, перечисленные выше, и необходимо, чтобы все измерения эякулята были четкие.

Эти переменные и большинство неконтролируемых факторов объясняют хорошо известную внутрииндивидуальную вариацию качества семени (Baker & Kovacs, 1985; Alvarez et al., 2003). Рис. 2.1. показывает изменения во времени показателей эякулята, оцененные методами, рекомендуемыми ВОЗ, от пяти здоровых молодых добровольцев, участвующих в группе плацебо в эксперименте по изучению мужской контрацепции. Такая вариабельность должна быть учтена при интерпретации семиологического анализа.

- Невозможно охарактеризовать качество эякулята мужчины при анализе единственного образца семени.
- Полезно оценить два или три образца для получения основных данных (Poland et al., 1985; Berman et al., 1996; Carlsen et al., 2004; Castilla et al., 2006; Keel, 2006).

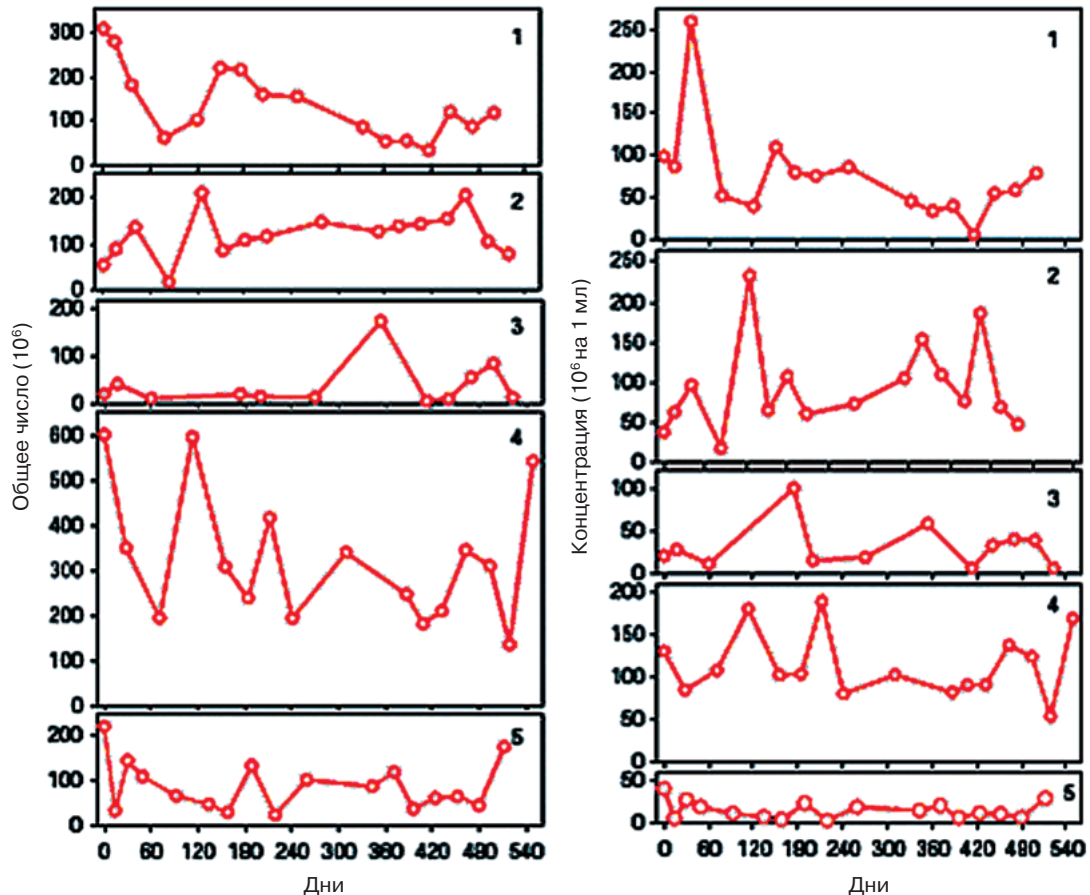
Несмотря на то, что измерения, проведенные на всей популяции сперматозоидов в эякуляте, не определяют оплодотворяющей способности половых клеток, достигших места оплодотворения, семиологический анализ, однако, дает необходимую информацию по клиническому статусу пациента. Все аспекты сбора эякулята и анализ должны быть проведены по тщательно стандартизованным процедурам, тогда результаты дадут обоснованную и полезную информацию. Тесты, приведенные в данной главе, описывают процедуры, которые составляют важные этапы при оценке эякулята.

Семиологический анализ включает следующие этапы (которые описаны более подробно в соответствующих разделах).

В первые 5 мин после получения:

- Размещение контейнера с образцом в инкубатор при 37° С для разжижения.

Рис. 2.1 Вариации общего числа сперматозоидов (а) и их концентрации (10⁶/мл) (по оси абсцисс) на протяжении 1,5- годового периода (дни, по оси ординат).



Данные любезно предоставлены Schering Plough и Bayer Schering Pharma AG

10 ЧАСТЬ I Исследование эякулята человека

В период с 30 до 60 мин после получения:

- Оценка разжижения и внешнего вида эякулята.
- Измерение объема эякулята.
- Измерение pH (если требуется).
- Подготовка нативного препарата для оценки микроскопических параметров, подвижности сперматозоидов и разведение образца, требуемое для подсчета количества половых клеток.
- Оценка «живые-мертвые» (если процент подвижных клеток низок).
- Приготовление мазка для оценки морфологии сперматозоида.
- Приготовление разведения эякулята для расчета концентрации сперматозоидов.
- Оценка количества сперматозоидов.
- Выполнение смешанной антиглобулиновой реакции (MAR-тест) (если требуется).
- Подсчет пероксидаза-положительных клеток (если округлые клетки присутствуют).
- Приготовление сперматозоидов для теста с иммунными шариками (если необходимо).
- Центрифугирование эякулята (если необходимо оценить биохимические маркеры).

В течение 3 часов после сбора эякулята:

- Доставка образцов в микробиологическую лабораторию (если необходимо).

После 4 часов после сбора эякулята:

- Фиксация, окраска и оценка мазков на предмет морфологии сперматозоидов.

Позднее в тот же день (или на следующий день, если образец заморозить)

- Оценка маркеров желез дополнительной секреции (если необходимо).
- Выполнение непрямого теста с иммунными шариками (если необходимо).

2.2 Сбор образцов

2.2.1 Подготовка

- Образцы следует собирать в специальной комнате вблизи лаборатории для того, чтобы исключить колебания температуры и контролировать время между сбором и анализом (см. Раздел 2.2.5 и 2.2.6).
- Образцы следует собирать при половом воздержании от 2 до 7 дней. Если необходимы дополнительные образцы, число дней половой абстиненции следует сохранять при каждом визите.

- Мужчине следует дать четко написанные и устные инструкции, касающиеся сбора образца эякулята. В них следует подчеркнуть, что образец эякулята должен быть полностью собран, и что пациенту следует сообщить о любых потерях какой-либо фракции образца.
- Следующую информацию необходимо зафиксировать в сопроводительной форме (см. Приложение 6, раздел А6.1.): имя пациента, дата рождения и номер карты, период полового воздержания, дату и время сбора образца, потеря эякулята, любые трудности при получении семени, а также временной интервал между сбором семени и началом семиологического анализа.

2.2.2 Сбор эякулята для диагностических или исследовательских целей

- Образец следует получать путем мастурбации и семяизвержения в чистый, с широким горлом контейнер из стекла или пластика, проверенного на нетоксичность для сперматозоидов (см. Бокс 2.1).
- Контейнер с образцом следует держать при температуре от 20° С до 37° С для того, чтобы избежать резких перепадов, которые могут повредить сперматозоиды после эякуляции. Контейнер должен быть промаркирован фамилией пациента и идентификационным номером, а также датой и временем сбора образца.
- Контейнер с образцом помещают на стол или в инкубатор (37° С) для разжижения семени.
- Следует отметить в отчете, если образец собран не полностью, особенно, если первая, богатая сперматозоидами порция, была утеряна. Если образец собран не полностью, второй образец следует собирать после периода полового воздержания от 2 до 7 дней.

Бокс 2.1 Подтверждение возможности сбора образца семени в контейнер

Отберите несколько образцов семени с высокой концентрацией сперматозоидов и хорошей их подвижностью. Поместите половину каждого образца в контейнер с доказанной нетоксичностью (контроль), а другую половину образца в тестируемый контейнер. Оцените подвижность сперматозоидов (см. Раздел 2.5) через каждый час в течение 4 часов при комнатной температуре или при 37° С. Если никаких различий в каждой временной точке между контролем и тестируемым образцом не будет обнаружено ($P < 0,05$ согласно парному t -тесту), тестируемый контейнер можно считать нетоксичным для сперматозоидов и удовлетворяющим требованиям по сбору эякулята.

2.2.3 Стерильный сбор эякулята для вспомогательных репродуктивных технологий

Сбор эякулята выполняют аналогично получению семени для диагностических целей (см. Раздел 2.2.2), но контейнер с образцами, наконечники пипеток и пипетки для смешивания должны быть стерильными.

2.2.4 Стерильный сбор эякулята для микробиологического анализа

В данной ситуации микробиологическая контаминация от источников не семенного происхождения (то есть организмы-симбионты с кожи человека) должна быть исключена. Контейнер с образцами, наконечники пипеток и пипетки для смешивания должны быть стерильными.

Обследуемый должен:

- Помочиться.
- Вымыть руки и пенис с мылом для того, чтобы снизить риск контаминации образца организмами-симбионтами с кожи.
- Сполоснуть мыло.
- Высушить руки и пенис свежим одноразовым полотенцем.
- Собрать эякулят в стерильный контейнер.

Важно: Время между сбором образца семени и началом исследования в микробиологической лаборатории не должно превышать 3 ч.

2.2.5 Сбор семени в домашних условиях

- Образец может быть собран в домашних условиях в исключительных случаях, таких как доказанная неспособность получить эякулят путем мастурбации в клинике или недостаточно соответствующие условия вблизи лаборатории.
- Мужчине следует дать четкие письменные и устные инструкции относительно сбора и транспортировки образца семени. Следует обратить внимание на то, чтобы весь эякулят был собран в контейнер, включая первую, богатую сперматозоидами фракцию, и что обследуемый должен сообщить о любых потерях какой-либо фракции эякулята. Следует отметить в отчете, если образец собран не полностью.
- Мужчине необходимо выдать предварительно взвешенный контейнер, с его именем и номером его медицинской карты.
- Пациент должен записать время получения образца и доставить его в лабораторию в течение 1 ч после эякуляции.
- Во время транспортировки в лабораторию образец следует хранить при температуре от 20° С до 37° С.
- В отчете следует отметить, что образец был собран в домашних условиях или в другом месте вне лаборатории.

2.2.6 Сбор эякулята с помощью презерватива.

- Образец может быть собран в презерватив во время сексуального контакта только в исключительных случаях, таких как доказанная невозможность сбора семени посредством мастурбации.
- Только специальные нетоксичные презервативы, разработанные для сбора эякулята, могут быть использованы; такие презервативы коммерчески доступны.

- Обследуемому следует дать информацию от производителя по использованию кондома, его закрытию и транспортировке в лабораторию.
- Пациенту следует записать время эякуляции и доставить образец в лабораторию в течение 1 ч после сбора.
- Во время транспортировки в лабораторию образец следует хранить при температуре от 20° С до 37° С.
- В отчете следует отметить, что образец был собран с помощью специального презерватива по время полового контакта в домашних условиях или в другом месте вне лаборатории.

Важно: Обычные латексные презервативы нельзя использовать для сбора образца, так как они содержат реагенты, которые влияют на подвижность сперматозоидов (Jones et al., 1986).

Комментарий 1: Прерванный половой акт является ненадежным способом сбора эякулята, так как первая порция эякулята, которая содержит максимальное число сперматозоидов, может быть утеряна. Более того, возможна клеточная и бактериологическая контаминация образца, а низкий pH влагалища может негативно отразиться на подвижности сперматозоидов.

Комментарий 2: Если мужчина не способен собрать эякулят, некоторую информацию о сперматозоидах можно получить, выполняя посткоитальный тест (см. Раздел 3.3.1)

2.2.7 Меры безопасности при работе с образцами

Образцы эякулята могут содержать возбудителей опасных инфекционных заболеваний (например, ВИЧ, гепатит, герпес), поэтому работа с ними требует предельной осторожности. Если образец должен быть использован для биоанализа, внутриматочной инсеминации (ВМИ), экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) или интрацитоплазматической инъекции в цитоплазму ооцита (ИКСИ) (см. Раздел 5.1) или если необходимо выполнить культивирование сперматозоидов для микробиологического анализа (см. Раздел 2.2.4), должны быть использованы стерильные материалы и методы. Следует строго придерживаться техники безопасности, описанной в Приложении 2; хорошая лабораторная практика (good laboratory practice) является основным принципом для безопасности лаборатории (ВОЗ, 2004).

2.3 Первоначальная макроскопическая оценка эякулята

Семиологический анализ следует начинать с простого осмотра эякулята после разжижения, желательно через 30 мин, но не более чем через 1 ч после семяизвержения для того, чтобы предотвратить дегидратацию или изменения температуры, которые могут влиять на качество эякулята.

2.3.1 Разжижение

Сразу же после семяизвержения в специальный контейнер эякулят представляет собой обычно полутвердую коагулированную массу. В течение нескольких минут при комнатной температуре семенная жидкость обычно начинает разжижаться (становится водянистой), и со временем превращается в гетерогенную смесь с взвесями. По мере разжижения эякулят становится однородным и довольно водянистым, а в финальной стадии остаются только небольшие области коагуляции. Весь образец обычно разжижается в течение 15 мин при комнатной температуре, хотя редко разжижение может занимать до 60 мин и более. Если полного разжижения не произошло за 60 мин, это следует записать. Семиологические образцы, собранные в домашних условиях или посредством презерватива, нормально разжижаются за время доставки их в лабораторию. В норме эякулят может содержать желеобразные гранулы (желатиновые тельца), которые не разжижаются; они не имеют никакого клинического значения. Присутствие в эякуляте волокон слизи, при этом, может повлиять на показатели семиологического анализа.

Важно 1: Разжижение можно видеть как макроскопически, как описано выше, так и микроскопически. Неподвижные сперматозоиды начинают двигаться, когда эякулят разжижен. Если неподвижные сперматозоиды наблюдают при микроскопической оценке, необходимо выделить больше времени для завершения процесса разжижения.

Важно 2: Во время разжижения аккуратное постоянное помешивание или вращение контейнера с образцом на двухмерном шейкере либо при комнатной температуре, либо в условиях инкубатора при 37°C может помочь достигнуть гомогенизации образца.

Важно 3: Если эякулят не разжижается в течение 30 мин, не следует приступать к семиологическому анализу, а следует подождать еще 30 мин. Если разжижение не произошло в течение 60 мин, продолжайте процедуру, как описано в Разделе 2.3.1.1.

2.3.1.1 Медленное разжижение

Иногда образцы могут не разжижаться, что делает оценку эякулята затруднительным. В этих случаях может быть необходимо механическое перемешивание либо воздействие ферментами.

1. Некоторые образцы можно подвергнуть разжижению с помощью добавления равного объема физиологического раствора (например, фосфатного буфера Дульбекко; Dulbecco's phosphate-buffered saline; см. Приложение 4, раздел A4.2.) с последующим непрерывным пипетированием.
2. Неоднородность можно снизить многократным (6–10 раз) аккуратным пипетированием эякулята через иглу с тупым концом диаметром G18 (внутренний диаметр 0,84 мм) или G19 (внутренний диаметр 0,69 мм), прикрепленную к шприцу.
3. Добавление бромелайна, протеолитического фермента (ЕС 3.4.22.32), может способствовать разжижению (см. Бокс 2.2.).

Бокс 2.2 Приготовление бромелайна

Подготовьте 10МЕ/мл бромелайна на фосфатном буфере Дульбекко (см. Приложение 4, раздел А4.2.); его достаточно трудно растворить, но с помощью помешивания большая часть частиц растворится в течение 15–20 мин. Разведите эякулят 1+1 (1:2) в 10 МЕ/мл бромелайна, перемешайте наконечником пипетки и инкубируйте при 37°С в течение 10 мин., смешайте образец тщательно перед дальнейшим анализом.

Комментарий: Эти процедуры могут влиять на биохимические показатели семенной плазмы, подвижность сперматозоидов и их морфологию, поэтому их использование должно быть записано. Разведение 1+1 (1:2) эякулята бромелайном должно быть учтено при расчете концентрации сперматозоидов.

2.3.2 Вязкость эякулята

После разжижения вязкость образца можно оценить с помощью аккуратной аспирации эякулята в одноразовую пластиковую пипетку с широким горлом (приблизительно 1,5 мм в диаметре), позволяя ему капать и наблюдая длину формирующейся нити. В норме эякулят выходит из пипетки небольшими дискретными каплями. Если вязкость аномальная, капля будет формировать нить более 2 см в длину.

Альтернативно, вязкость можно оценить с помощью введения стеклянной палочки в образец и наблюдать длину нити, которая формируется при выведении палочки из семени. Вязкость следует считать аномальной, когда длина нити превышает 2 см.

В отличие от частично не разжиженного образца, вязкость эякулята с гомогенной структурой не будет изменяться со временем. Высокую вязкость можно распознать по эластичным качествам образца, который сильно слипается при попытке его пипетирования. Методы снижения вязкости являются теми же самыми, что и при медленном разжижении (см. Раздел 2.3.1.1).

Комментарий: Высокая вязкость может препятствовать правильному определению подвижности сперматозоидов, их концентрации, определению сперматозоидов, покрытых антителами, и измерению биохимических маркеров.

2.3.3 Внешний вид эякулята

В норме разжиженный семиологический образец должен быть гомогенным, сероватого цвета, слегка опалесцирующим. Он может быть менее прозрачным, если концентрация сперматозоидов очень низкая; цвет может также быть различным, например, красно-коричневым, если в эякуляте присутствуют эритроциты (гемоспермия) или желтым, если мужчина болен желтухой или принимает некоторые витамины или лекарственные препараты.

2.3.4 Объем эякулята

Объем эякулята составляет по большей части секрет семенных пузырьков и простаты с небольшим количеством секрета луковично-уретральных желез и эпидидимиса. Точное измерение объема важно для любых оценок эякулята, так как оно позволяет рассчитать общее количество сперматозоидов и не сперматогенных клеток в эякуляте.

Объем лучше всего измерять путем взвешивания образца в контейнере, в котором он был собран.

- Соберите образец в предварительно взвешенный, чистый, одноразовый контейнер.
- Взвесьте контейнер с эякулятом.
- Вычтите вес контейнера.
- Рассчитайте объем эякулята, исходя из его веса, при условии, что плотность семени составляет 1 г/мл (Auger et al., 1995). Плотность эякулята варьирует между 1,043 и 1,102 г/мл (Huggins et al., 1942; Brazil et al., 2004a; Cooper et al., 2007).

Важно: Пустые контейнеры могут отличаться по весу, поэтому каждый контейнер следует предварительно индивидуально взвешивать. Вес можно записать на контейнере до его выдачи пациенту. Используйте маркер для написания на самом контейнере либо на его этикетке. Если используется этикетка для записи веса, ее следует прикрепить до взвешивания пустого контейнера.

Альтернативно, объем можно измерить напрямую.

- Соберите образец непосредственно в градуированный стеклянный цилиндр с широким горлом. Они доступны коммерчески.
- Оцените объем эякулята непосредственно по шкале (точность 0,1 мл).

Важно: Измерение объема путем аспирации образца из контейнера в пипетку или шприц или переливанием его в измерительный цилиндр не рекомендуется, так как не весь образец будет перелит, и поэтому объем будет недооценен. Потеря объема может составлять от 0,3 до 0,9 мл (Brazil et al., 2004a; Iwamoto et al., 2006; Cooper et al., 2007).

Комментарий 1: Низкий объем эякулята говорит об обструкции семявыносящих протоков или врожденном двустороннем отсутствии vas deferens (CBAVD) (de la Taille et al., 1998; Daudin et al., 2000; von Eckardstein et al., 2000; Weiske et al., 2000), состояния, при которых семенные пузырьки также развиты слабо.

Комментарий 2: Низкий объем эякулята может также быть результатом проблем сбора спермы (потеря какой-либо фракции эякулята), вследствие частично ретроградной эякуляции или андрогенной недостаточности.

Комментарий 3: Высокий объем спермы может отражать активность экссудации в случаях активного воспаления органов дополнительной секреции.

2.3.4.1 Минимальное референсное значение

Минимальным референсным значением для объема эякулята является 1,5 мл (5-й перцентиль, 95% доверительный интервал 1.4–1.7.).

2.3.5 pH эякулята

pH спермы отражает баланс между значениями pH секретов желез дополнительной секреции, в основном щелочным секретом семенных пузырьков и кислотным секретом предстательной железы. pH следует измерять после разжижения в одно и то же время, предпочтительно после 30 мин, но в любом случае в течение 1 ч после семяизвержения, так как pH изменяется при снижении уровня CO₂, которое происходит после эякуляции.

В норме следует использовать pH-бумагу с диапазоном значений между 6,0 и 10,0.

- Хорошо перемешайте сперму (см. Бокс 2.3.).
- Равномерно нанесите каплю спермы на pH-бумагу.
- Подождите, пока pH-бумага не приобретет равномерный насыщенный цвет (<30 сек).
- Сравните цвет с калибровочной шкалой и оцените pH.

Важно: Точность pH-бумаги следует проверять на соответствие известным стандартам.

Для вязких образцов pH небольшой аликвоты спермы можно измерить с использованием pH-метра, разработанного для измерения pH вязких растворов (Haugen & Grotmol, 1998).

2.3.5.1 Референсные значения

В настоящее время существует несколько референсных значений для pH спермы фертильных мужчин. Ожидая больше данных, настоящее руководство оставляет консенсусное значение 7,2 и ниже как пороговое.

Комментарий 1: Если pH образца спермы ниже 7,0 при низком объеме и низком количестве сперматозоидов, можно подозревать обструкцию семявыносящего тракта или врожденное двустороннее отсутствие vas deferens (de la Taille et al., 1998; Daudin et al., 2000; von Eckardstein et al., 2000; Weiske et al., 2000), заболевания, при которых семенные пузырьки также недостаточно развиты.

Комментарий 2: pH спермы увеличивается со временем после эякуляции, поэтому высокий уровень pH немного может дать немного полезной клинической информации.

2.4 Первоначальная микроскопическая оценка эякулята

Фазово-контрастный микроскоп рекомендуется использовать для всех оценок неокрашенных препаратов нативного эякулята (см. Приложе-

ние 3 для настройки микроскопа). Первоначальная микроскопическая оценка образца спермы включает обзор препарата при совокупном увеличении $\times 100$ (то есть комбинация объектива $\times 10$ и окуляра $\times 10$).

Это обеспечивает общий обзор образца спермы и позволяет оценить:

- формирование нитей слизи;
- агрегацию и агглютинацию сперматозоидов;
- присутствие не сперматогенных клеток, то есть клеток эпителия, округлых клеток (лейкоциты и незрелые половые клетки), отдельных головок и жгутиков сперматозоидов.

Препарат следует затем оценить при совокупном увеличении $\times 200$ или $\times 400$ (то есть комбинация объектива $\times 20$ или $\times 40$ и окуляра $\times 10$).

Это позволит:

- оценить подвижность сперматозоидов (см. Раздел 2.5);
- определить разведение, необходимое для точной оценки числа сперматозоидов (см. Раздел 2.8).

2.4.1 Полное смешивание и представление образца спермы

Структура разжиженного эякулята может затруднять представление (состояние) образца спермы для анализа. Если образец недостаточно перемешан, анализ двух отдельных аликвот может показать различия в подвижности сперматозоидов, жизнеспособности, концентрации и морфологии. Для получения воспроизводимых данных образец следует тщательно перемешать до того, как аликвота будет отобрана для оценки (см. Бокс 2.3), а результаты оценки повторных аликвот следует согласовывать до того, как значения будут приняты. Согласования между повторными аликвотами определяются для числа сперматозоидов с помощью распределения Пуассона (см. Боксы 2.7 и 2.10 и Таблицы 2.4 и 2.5) и для процентов с помощью биномиального распределения (см. Боксы 2.5 и 2.6 и Таблицу 2.1).

Бокс 2.3 Тщательное перемешивание эякулята

До взятия аликвоты семени для анализа хорошо перемешайте образец в контейнере без формирования пузырьков воздуха. Этого можно достигнуть путем аспирации образца 10 раз в одноразовую пластиковую пипетку (стерильную, если нужно) с широким горлышком (приблизительно 1,5 мм в диаметре). Не производите перемешивание на вихре при высоких скоростях, так как это может повредить сперматозоиды.

2.4.2 Приготовление влажного препарата

- Хорошо перемешайте образец спермы (см. Бокс 2.3.).
- Возьмите аликвоту спермы сразу же после перемешивания, не позволяя сперматозоидам осесть в суспензии.
- Перемешайте образец спермы до взятия повторной аликвоты.

Объем аликвоты и величина покровного стекла должны быть стандартизированы таким образом, чтобы анализ выполняли на препарате с фиксированной глубиной около 20 мкм (см. Бокс 2.4), что позволяет сперматозоидам свободно перемещаться.

- Поместите стандартный объем аликвоты эякулята, то есть 10 мкл, на чистое предметное стекло.
- Покройте предметное стекло покровным, то есть 22 × 22 мм для глубины 10 мкл, для того, чтобы обеспечить глубину камеры приблизительно 20 мкл (см. Бокс 2.4). Вес покровного стекла позволит эякуляту равномерно распределиться.
- Будьте аккуратны во избежание формирования и распространения воздушных пузырей между покровным и предметным стеклом.
- Оцените влажный препарат как можно скорее, пока образец не сместился.

Бокс 2.4 Глубина влажного препарата

Глубину препарата (D , мкм) можно рассчитать путем деления объема образца (V , мкл= мм^3) на площадь покрываемой поверхности (A , мм^2): $D = V/A$. Таким образом, объем образца 10 мкл, помещенный на чистое предметное стекло и покрытый стеклом 22 × 22 мм (площадь 484 мм^2) дает глубину камеры 20,7 мкм; образец объемом 6,5 мкл, накрытый стеклом 18 × 18 мм (площадь поверхности 324 мм^2), обеспечивает глубину 20,1 мкм; образец объемом 11 мкл, накрытый стеклом 21 × 26 мм (площадь 546 мм^2), — камеру глубиной 20,1 мкм. Иногда может потребоваться образец с большей глубиной: образец объемом 40 мкл накрывают покровным стеклом 24 × 50 мм (площадь 1200 мм^2), что дает глубину 33,3 мкм.

Важно 1: Глубина препарата менее 20 мкм ограничивает вращательное движение сперматозоидов (Le Lannou et al., 1992; Kraemer et al., 1998).

Важно 2: Если влажный препарат оказался слишком глубоким, будет трудно оценивать сперматозоиды, так как они могут двигаться как в фокусе, так и вне его.

Важно 3: Если число сперматозоидов в поле зрения сильно меняется, образец не является гомогенным. В таких случаях образец спермы следует еще раз тщательно перемешать (см. Бокс 2.3) и приготовить новый препарат, как описано выше.

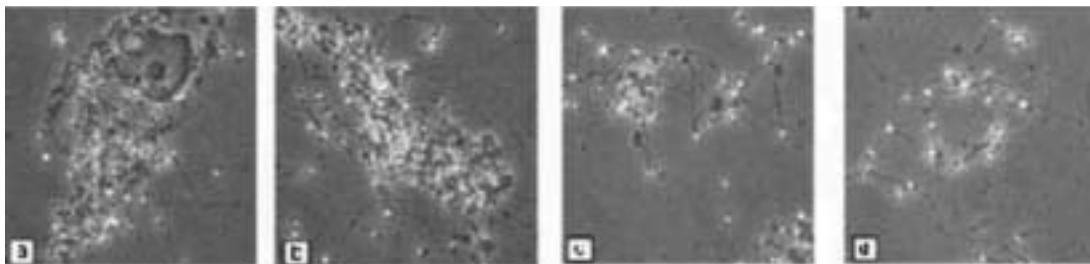
Важно 4: Потеря гомогенности может также произойти из-за аномальной консистенции, аномального разжижения (см. Раздел 2.3.1), агрегации сперматозоидов (см. Раздел 2.4.3) или агглютинации сперматозоидов (см. Раздел 2.4.4).

2.4.3 Агрегация сперматозоидов

Слипание либо неподвижных сперматозоидов друг с другом, либо подвижных сперматозоидов с нитями слизи, не сперматогенными клетками или дебрисом, как полагают, является неспецифической агрегацией (Рис. 2.2) и этот факт следует указывать в результатах семиологического анализа.

Рис.2.2 Неспецифическая агрегация сперматозоидов в эякуляте.

Микрофотографии сперматозоидов, которые агрегируют с эпителиальной клеткой (а), клеточным дебрисом (b) или с мертвыми сперматозоидами (с, d).



Микрофотографии любезно предоставлены С. Brazil.

2.4.4 Агглютинация сперматозоидов

Агглютинация относится только к подвижным сперматозоидам, которые приклеиваются друг к другу, головка к головке, жгутик к жгутику или смешанным образом. Часто сперматозоиды в агглютинатах имеют выраженную покачивающуюся подвижность, но иногда сперматозоиды настолько сильно агглютинируют, что их движение достаточно ограничено. Все подвижные сперматозоиды, которые прилипают друг к другу головками, жгутиками или шейками, должны быть отмечены.

Преобладающий тип агглютинации (выраженный по степеням (степени 1–4) и область склеивания сперматозоидов (степень А–Е) должны быть записаны (Rose et al., 1976) (см. Рис. 2.3):

- | | |
|-----------------------------------|--|
| • Степень 1: изолированные | менее 10 сперматозоидов на агглютинат, большинство сперматозоидов свободны |
| • Степень 2: средняя степень | 10–50 сперматозоидов на агглютинат, свободные сперматозоиды |
| • Степень 3: значительная степень | в агглютинатах более 50 сперматозоидов, некоторые клетки остаются свободными |
| • Степень 4: тяжелая степень | все сперматозоиды агглютинируют, агглютинаты взаимосвязаны |

Важно: Подвижные сперматозоиды, прилипающие к округлым клеткам, клеточному дебрису или неподвижным сперматозоидам, склеенным друг с другом (агрегация), не следует рассматривать как агглютинацию.

Рис.2.3 Схематическое отображение различных типов агглютинации сперматозоидов

Участок сперматозоида, вовлеченный в агглютизацию	Степень агглютинации			
	1. Изолированные (менее 10 сперматозоидов на агглютинат, большинство сперматозоидов свободны)	2. Средняя степень (10–50 сперматозоидов на агглютинат, свободные сперматозоиды)	3. Значительная степень (в агглютинатах более 50 сперматозоидов, некоторые сперматозоиды остаются свободными)	4. Тяжелая степень (все сперматозоиды агглютинируют, агглютинаты взаимосвязаны)
A. Головка к головке				
B. Жгутик-жгутик (головки сперматозоидов остаются свободными и двигаются от агглютинатов)				
C. Кончик жгутика — кончик жгутика				
D. смешанная агглютинация (присутствуют как агглютинаты «головка к головке», так и «жгутик-жгутик»)				
E. Беспорядочная агглютинация (головки и жгутики спутаны. Головки не отходят от агглютинатов, а входят в состав агглютинатов «жгутик-жгутик»)				

Воспроизведено из: *Rose et al. (1976)* с любезного разрешения *Wiley-Blackwell*.

Комментарий 1: Присутствие агглютинации не обязательно указывает на иммунологическую причину бесплодия, однако она подразумевает возможное присутствие антиспермальных антител; необходимо дальнейшее обследование (см. Раздел 2.20)

Комментарий 2: Тяжелая степень агглютинации может влиять на оценку подвижности сперматозоидов и их концентрацию.

2.4.5 Клеточные элементы, отличные от сперматозоидов

Эякулят содержит клетки, отличные от сперматозоидов, некоторые из которых могут иметь клиническое значение. Они включают клетки эпителия из мочеполового тракта, а также лейкоциты и незрелые половые клетки, последние два типа клеток объединяют в один тип и называют округлыми клетками (Johanisson et al., 2000). Они могут быть идентифицированы на окрашенных мазках при увеличении $\times 1000$ (см. Раздел 2.12, вклейки 13 и 14, а также Раздел 2.19). Эти типы клеток можно более точно идентифицировать и классифицировать с помощью окраски на пероксидазную активность (см. Раздел 2.18) или антигеном CD45 (см. Раздел 3.2). Их концентрацию можно оценить, как и для сперматозоидов, на влажных препаратах (см. Раздел 2.18.1.5) или из соотношения этих клеток к числу сперматозоидов на окрашенных мазках и из концентрации сперматозоидов (см. Раздел 2.12.1).

2.5 Подвижность сперматозоидов

Процент прогрессивно-подвижных сперматозоидов (см. Раздел 2.5.1) связывают с эффективностью наступления беременности (Jouannet et al., 1988; Larsen et al., 2000; Zinaman et al., 2000). Методы оценки подвижности, включая компьютерный анализ подвижности (CASA), описаны в Разделе 3.5.2.

Подвижность сперматозоидов в эякуляте следует оценивать сразу же после разжижения образца, предпочтительно через 30 мин, но в любом случае в течение 1 ч после семяизвержения для того, чтобы ограничить действие обезвоживания, pH или температурных колебаний на подвижность.

- Тщательно перемешайте образец спермы (см. Бокс 2.3).
- Возьмите аликвоту спермы сразу же после перемешивания, не позволяя сперматозоидам осесть в суспензии.
- Перемешайте образец спермы до взятия повторной аликвоты.
- Для каждой из аликвот подготовьте влажный препарат глубиной приблизительно 20 мкм (см. Раздел 2.4.2).
- Подождите, пока образец распространится по стеклу (в течение 60 сек).
- Оцените препарат в фазово-контрастном микроскопе при увеличении $\times 200$ или $\times 400$.
- Подсчитайте приблизительно 200 сперматозоидов на каждую аликвоту для вычисления процента сперматозоидов различных категорий подвижности.
- Сравните значения для каждой аликвоты для того, чтобы проверить, приемлемо близки ли они. Если да, продолжайте вычисления, если нет, подготовьте новые образцы спермы.

Важно 1: Процедура может быть выполнена при комнатной температуре или при 37° С на нагреваемой поверхности микроскопа, но процесс следует стандартизировать в каждой лаборатории. Если подвижность сперматозоидов оценивают при 37° С, образец спермы следует инкубировать при этой температуре, а препарат подготовить с предварительным нагревом предметного и покровного стекла до нужной температуры.

Важно 2: Рекомендовано использование окулярной сетки с решеткой (см. Рис. 2.4а) для того, чтобы ограничить поле зрения; это позволит одну и ту же площадь на предметном стекле оценить во время повторных вычислений. Сначала оцените прогрессивную подвижность, затем непрогрессивную подвижность и неподвижность (см. Раздел 2.5.1). Ограниченная область расчета и, таким образом, число оцениваемых сперматозоидов гарантируют, что несколько областей препарата будут оценены по подвижности.

2.5.1 Категории подвижности сперматозоидов

Рекомендована простая система градации подвижности сперматозоидов, которая позволяет различать сперматозоиды с прогрессивным и непрогрессивным движением и неподвижные сперматозоиды. Подвижность каждого сперматозоида оценивается следующим образом.

- Прогрессивно-подвижные (PR, *progressive motility*): сперматозоиды,двигающиеся активно, либо линейно, либо по кругу большого радиуса, независимо от скорости.
- Непрогрессивно-подвижные (NP, *non-progressive motility*): все другие виды движений с отсутствием прогрессии, то есть плавающие по кругу небольшого радиуса, жгутик с трудом смещает головку или когда наблюдают только биение жгутика.
- Неподвижные (IM, *immotility*): отсутствие движения.

Комментарий 1: В предыдущем издании данного Руководства рекомендовано, чтобы сперматозоиды с прогрессивно-подвижным движением были подразделены на быстрые и медленные, со скоростью >25 мкм/сек при 37° С, определяемые как категория «а». Однако достаточно трудно для специалистов определить без ошибок быстрое поступательное движение (Cooper & Yeung, 2006).

Комментарий 2: При обсуждении подвижности сперматозоидов важно точно определять общую подвижность (PR+NP) или прогрессивную подвижность (PR).

2.5.2 Приготовление и оценка образца спермы по подвижности

- Если подвижность необходимо оценить при 37°С, включите нагревательную поверхность заранее, за 10 мин, для того, чтобы установилась нужная температура.
- Подготовьте влажный препарат глубиной 20 мкм (см. Раздел 2.4.2).

- Оцените препарат в фазово-контрастном микроскопе при увеличении $\times 200$ или $\times 400$.
- Подождите, пока образец прекратит растекаться.
- Найдите сперматозоиды в области, отстающей от края покровного стекла по крайней мере на 5 мм (см. Рис. 2.4b) для того, чтобы предотвратить влияние высыхания на их подвижность.
- Последовательно исследуйте предметное стекло во избежание повторного анализа одной и той же области. Чаще меняйте поля зрения. Избегайте выбора поля зрения на основании количества подвижных сперматозоидов (выбор анализируемого поля зрения должен быть случайным).
- Начните расчет в поле зрения, выбранном случайно. Не ждите сперматозоиды, которые плавают вне поля или пересекают границы окулярной решетки.
- Оцените подвижность всех сперматозоидов внутри выбранной области. Это просто сделать, если использовать окулярную решетку (см. Рис. 2.4a). Исходя из концентрации сперматозоидов, выберите часть поля или часть решетки для расчета, то есть отметьте только верхнюю строку решетки, если концентрация сперматозоидов высокая; используйте всю решетку, если концентрация сперматозоидов низкая.
- Анализируйте и производите расчет быстро, чтобы избежать переоценки числа подвижных сперматозоидов. Цель заключается в том, чтобы подсчитать все подвижные сперматозоиды в выбранной области мгновенно; избегайте подсчета клеток, которые присутствуют в начале, так и тех, которые перемещаются вне области сетки во время оценки, что может оказывать влияние на истинное число подвижных сперматозоидов.
- Первоначально анализируйте выбранную область сетки на клетки категории PR (см. Раздел 2.5.1). Следующими считайте сперматозоиды категории NP и в конце категории IM в одной и той же области. С приобретением опыта возможно проведение градации сперматозоидов на категории движения одновременно и охват большего поля зрения.
- Рассчитайте число сперматозоидов каждой категории подвижности с помощью лабораторного счетчика.
- Оцените суммарно, по крайней мере, 200 сперматозоидов не менее чем в 5 полях зрения каждой аликвоты для того, чтобы достичь приемлемо низкой ошибки (см. Бокс 2.5).
- Подсчитайте средний процент и различия между двумя процентными значениями для самой часто встречающейся категории подвижности (PR, NP и IM) в каждой аликвоте.
- Определите приемлемое различие из Табл. 2.1. или Рис. A7.2, Приложения 7. (Каждый показывает максимальное различие между двумя процентными значениями, которое допустимо в 95% образцов исключительно из-за ошибки выборочного обследования).
- Если различия между процентами приемлемо, запишите среднее значение для каждой категории подвижности (PR, NP и IM). Если разли-

чие слишком большое, подготовьте новые аликвоты спермы и повторите оценку (см. Бокс 2.6).

- Округлите среднее значение для каждой категории подвижности до наиболее близкого целого числа.

Важно 1: Оценивайте только интактные сперматозоиды (то есть сперматозоиды, имеющие и головку, и жгутик; см. Раздел 2.7.3), так как только интактные сперматозоиды используют для определения концентрации половых клеток. Не берите в расчет подвижные ацефалические сперматозоиды.

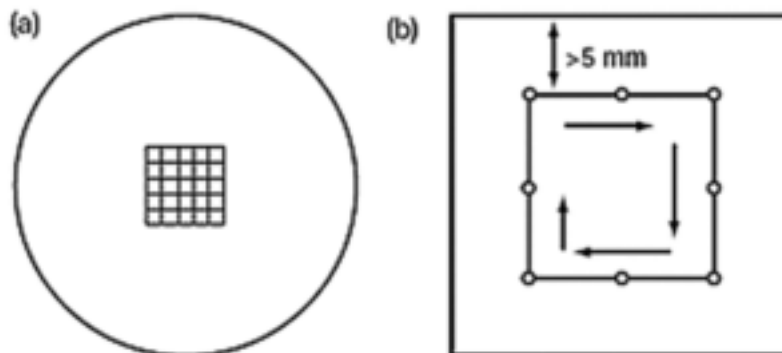
Важно 2: Если присутствуют сперматозоиды только двух категорий (например, PR прежде всего, затем NP или IM в одной и той же области) и расчет достиг 200 сперматозоидов до того, как все категории подвижности клеток были подсчитаны в данной области, подсчет необходимо продолжать за 200 клеток до того момента, пока все категории подвижности не будут оценены для того, чтобы избежать влияния на общую подвижность категории, рассчитанной первой.

Важно 3: Часто переоценивают подвижность сперматозоидов, но этого можно избежать, изменив порядок расчета (NP и IM сначала), используя окулярную сетку и понимая и избегая потенциальных источников ошибок (см. Раздел 7.13.3).

Важно 4: В редких случаях при неомогенных образцах спермы даже третья повторная аликвота может давать неприемлемые различия. В этом случае рассчитайте среднее всех аликвот и отметьте это в отчете.

Рис. 2.4 Вспомогательные инструменты для оценки подвижности сперматозоидов

- (a) Окулярная сетка, которая упрощает расчет подвижных и неподвижных сперматозоидов.
 (b) Последовательный отбор полей зрения для оценки подвижности сперматозоидов на расстоянии по крайней мере 5 мм от края покровного стекла.



Бокс 2.5 Ошибки при оценке процентных значений

Способ точного определения процентного значения зависит не только от числа рассчитанных сперматозоидов (N), но также и от истинных, но неизвестных, процентных значений (p) (биномиальное распределение). Приблизительная стандартная ошибка (SE) составляет $\sqrt{(p(100-p))/N}$ для процентных значений между 20 и 80. При выходе из данного диапазона используют более подходящий метод тригонометрического преобразования (\arcsin квадратного корня), $z = \sin^{-1}\sqrt{p/100}$ со стандартным отклонением $1/(2\sqrt{N})$ радианы, которое зависит только от числа подсчитанных сперматозоидов и не зависит от истинных процентов.

Таблица 2.1 Приемлемые различия между двумя процентными значениями средних, полученных из двойного расчета 200 сперматозоидов (всего 400 подсчитанных сперматозоидов)

Среднее значение (%)	Приемлемое различие*	Среднее значение (%)	Приемлемое различие*
0	1	66–76	9
1	2	77–83	8
2	3	84–88	7
3–4	4	89–92	6
5–7	5	93–95	5
8–11	6	96–97	4
12–16	7	98	3
17–23	8	99	2
24–34	9	100	1
35–65	10		

*На основании округленного 95% доверительного интервала.

Бокс 2.6 Сравнение процентных значений, полученных при повторении расчетов

Процентные значения следует округлять до ближайшего целого числа. Округление 0,5% обычно происходит до ближайшего круглого значения, например, 32,5% округляют до 32%, но 3,5% округляют до 4%. Отметим, что округленные проценты не должны превышать 100%. Если различия между повторными процентными значениями меньше либо равно значению, указанному в Табл. 2.1. для рассчитанного среднего, оценку следует принять и среднее записать как результат. При значениях больше допустимого предполагают, что допущены ошибки при подсчете или нарушено пипетирование, либо клетки недостаточно хорошо перемешаны с неравномерным распределением их в камере или на предметном стекле. Когда различия между процентными значениями больше допустимых, первые два расчетных числа забраковывают и производят переоценку. (Не нужно считать третий образец и выводить среднее трех чисел или брать среднее двух ближайших значений.) Для оценки подвижности сперматозоидов или их жизнеспособности с помощью только эозина или гипоосмотического набухания (HOS-тест) готовят свежие аликвоты спермы. Для оценки жизнеспособности сперматозоидов с помощью окраски мазков эозин-нигрозином

и оценки морфологии производят переоценку имеющихся предметных стекол.

В 95% доверительном интервале значений *cut-off* приблизительно 5% повторных измерений будут выходить за границы диапазона за счет только случайности (см. Приложение 7, Раздел A7.3). Точные биномиальные доверительные пределы могут сегодня быть сгенерированы на компьютере, и их используют в данном руководстве для графиков и таблиц для оценки согласованности между повторными измерениями.

2.5.3 Примеры с решениями

Пример 1. Подвижность сперматозоидов оценивают при двукратном подсчете 200 сперматозоидов: прогрессивное — 30% и 50%; непрогрессивное — 5% и 15%; неподвижные — 65% и 35%. Согласно табл. 2.1, большинство сперматозоидов попали в группу неподвижных со средним 50%, различие более 10% следует рассматривать как случайность. Так как наблюдаемое различие превышает это значение, результаты забраковывают и готовят дополнительные две аликвоты для перерасчета подвижности сперматозоидов.

Пример 2. Подвижность сперматозоидов оценили при двукратном подсчете 200 сперматозоидов: прогрессивное — 37% и 28%; непрогрессивное — 3% и 6%; неподвижные — 60% и 66%. Самая большая группа — неподвижные сперматозоиды, среднее значение составляет 63%, различие — 6%. Из таблицы 2.1. видим, что для среднего 63% различие свыше 10% следует рассматривать как случайность. Так как наблюдаемое различие меньше этого значения, результаты признаем годными и записываем средние значения PR 32%, NP 4%, IM 63%.

2.5.4 Минимальное референсное значение

Минимальным референсным значением для общей подвижности (PR+NP) будет 40% (5-й процентиль, 95% доверительный интервал 38–42).

Минимальным референсным значением прогрессивной подвижности (PR) принято значение 32% (5-й процентиль, 95% доверительный интервал 31–34).

Комментарий: Суммарное число прогрессивно-подвижных сперматозоидов в эякуляте имеет биологическое значение. Его получают путем умножения общего количества сперматозоидов в эякуляте (см. Раздел 2.8.7) на процент прогрессивно-подвижных клеток.

2.6 Жизнеспособность сперматозоидов

Жизнеспособность сперматозоидов, оцениваемая по целостности мембраны клетки, может быть определена рутинно на любом образце, но особенно важно определять их жизнеспособность когда число прогрессивно-подвижных сперматозоидов составляет менее 40%. Этот тест может обеспечить проверку на подвижность сперматозоидов, так как процент мертвых клеток не должен превышать (внутри ошибки выбороч-

ного обследования) процент неподвижных сперматозоидов. Доля живых клеток обычно превышает количество подвижных клеток.

Процент живых сперматозоидов рассчитывают, исходя из интактности клеточной мембраны, по отсутствию окраски или путем гипотонического набухания. Метод отсутствия окрашивания основан на том принципе, что поврежденные плазматические мембраны, подобные обнаруженным у неживых (мертвых) клеток, пропускают краску. Тест на гипоосмотическое набухание предполагает, что только клетки с интактными мембранами (живые клетки) будут набухать в гипотонических растворах.

Примеры каждого теста описаны ниже.

Жизнеспособность сперматозоидов должна быть оценена сразу же после разжижения, предпочтительно через 30 мин, но в любом случае в течение 1 ч после эякуляции для того, чтобы избежать повреждающего действия дегидратации или температурных колебаний на жизнеспособность.

Комментарий 1: Клинически важно знать, является ли неподвижный сперматозоид живым или мертвым. Тест на жизнеспособность должен быть проведен в том же образце, в котором рассчитывали подвижность сперматозоидов.

Комментарий 2: Присутствие большого количества живых, но неподвижных сперматозоидов может указывать на структурные дефекты жгутика (Chemes & Rawe, 2003); высокая доля неподвижных и неживых клеток (некрозооспермия) может указывать на патологию эпидидимиса (Wilton et al., 1988; Correa-Perez et al., 2004).

2.6.1 Тест на жизнеспособность с использованием окрашивания эозин-нигрозином

При данном одношаговом методе окрашивания используют нигрозин для увеличения контрастности между основным фоном и головками сперматозоидов, что помогает четче различать клетки. Метод также позволяет хранить предметные стекла для повторной оценки и для целей контроля качества (Björndahl et al., 2003).

2.6.1.1 Приготовление реагентов

1. Эозин Y: растворите 0,67 г эозина Y (цветовой индекс 45380) и 0,9 г хлорида натрия (NaCl) в 100 мл дистиллированной воды с небольшим нагревом.
2. Эозин-нигрозин: добавьте 10 г нигрозина (цветовой индекс 50420) к 100 мл раствора эозина Y.
3. Доведите суспензию до кипения, затем дайте ей остыть до комнатной температуры.
4. Профильтруйте раствор через фильтровальную бумагу (например 90 г/м²) для удаления осадка и желатиновых включений и храните в герметичной затемненной стеклянной таре.

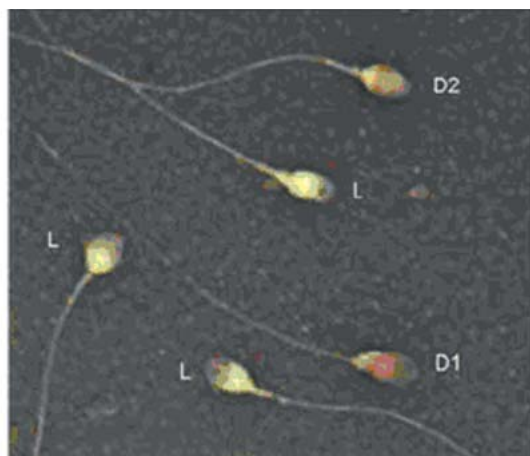
2.6.1.2 Процедура

1. Хорошо перемешайте образец спермы (см. Бокс 2.3).

2. Возьмите аликвоту 50 мкл и смешайте ее с равным объемом суспензии эозин-нигрозина, например в фарфоровой чашке или тестовой пробирке и подождите 30 сек.
3. Перемешайте образец спермы для взятия повторной аликвоты и смешайте ее с суспензией эозин-нигрозина, как описано в п. 2 выше.
4. Для каждой суспензии приготовьте мазок на предметном стекле (см. Раздел 2.13.2) и высушите его на воздухе.
5. Оцените сразу же после высушивания или позже после приготовления отсутствие осадка среды на стеклах (см. Раздел 2.14.2.5).
6. Оцените каждое предметное стекло в световом микроскопе при увеличении $\times 1000$ под иммерсионным маслом.
7. Подсчитайте число окрашенных (мертвые) и неокрашенных (живые) клеток с помощью лабораторного счетчика.
8. Подсчитайте 200 сперматозоидов в каждой аликвоте для того, чтобы достичь приемлемо низкой ошибки измерений (см. Бокс 2.5).
9. Вычислите среднее значение и различие между двумя процентами живых клеток из двух аликвот.
10. Определите приемлемость различий из Табл. 2.1 или Рис. A7.2, Приложение 7. (Каждое показывает максимальное различие между двумя процентными значениями, которые, как ожидается, попадут в 95% доверительный интервал.)
11. Если различие в процентных значениях приемлемо, запишите средний процент жизнеспособных сперматозоидов. Если различие слишком большое, приготовьте два новых препарата из свежих аликвот спермы и повторите оценку (см. Бокс 2.6).
12. Запишите средний процент живых сперматозоидов как ближайшее целое число.

Рис.2.5 Мазок, окрашенный эозин-нигрозином, в световом микроскопе

Сперматозоиды с красными (D1) или темно-розовыми (D2) головками считают мертвыми (повреждена мембрана), при этом сперматозоиды с белыми (L) или светло-розовыми головками — живыми (с интактной мембраной).



Микрофотография любезно предоставлена T.G. Соопер.

2.6.1.3 Оценка

1. Нигрозин обеспечивает темное окрашивание фона, что упрощает идентификацию бледно-окрашенных сперматозоидов.
2. В световом микроскопе живые сперматозоиды имеют белые головки, а мертвые окрашиваются красным или темно-розовым (рис. 2.5). Сперматозоиды с бледно-розовыми головками считают живыми.
3. Если окраска ограничена только областью шейки, а остальная часть головки не окрашена, считается, что мембрана имеет нарушения, но нет признаков гибели клетки и дезинтеграции всей мембраны. Такие клетки следует рассматривать как живые.

2.6.1.4 Минимальное референсное значение

Минимальным референсным значением для жизнеспособности (сперматозоиды с интактной мембраной) принято 58% (5-й процентиль, 95% доверительный интервал 55–63).

Комментарий: Общее число сперматозоидов с интактной мембраной в эякуляте имеет биологическое значение. Оно получается умножением общего числа сперматозоидов в эякуляте (см. Раздел 2.8.7) на число (в %) клеток с интактной мембраной.

2.6.2 Тест на жизнеспособность с использованием только эозина

Данный метод является простым и быстрым, но влажные препараты не подлежат хранению для проведения контроля качества.

2.6.2.1 Приготовление реагентов

1. NaCl, 0,9% (w/v): растворите 0,9 г NaCl в 100 мл дистиллированной воды.
2. Эозин Y, 0,5% (w/v): растворите 0,5 г эозина Y (цветовой показатель 45380) в 100 мл 0,9% NaCl.

Важно: Некоторые коммерчески доступные растворы эозина являются гипотоническими водными растворами, которые негативно влияют на сперматозоиды и дают ложно-положительные результаты (Björndahl et al., 2004). Если используете такой раствор, добавьте 0,9 г NaCl к 100 мл раствора для увеличения осмолярности.

2.6.2.2 Процедура

1. Тщательно перемешайте образец спермы (см. Бокс 2.3).
2. Возьмите аликвоту спермы 5 мкл и соедините с 5 мкл раствора эозина на предметном стекле для микроскопирования. Перемешайте вращательными движениями наконечником пипетки образец на стекле.
3. Покройте предметное стекло покровным — размер 22 × 22 мм и оставьте на 30 сек.
4. Перемешайте образец спермы, возьмите повторную аликвоту, смешайте ее с эозином и повторите шаги, описанные в п. 2 и 3 выше.

5. Оцените каждое предметное стекло предпочтительно в отрицательном фазово-контрастном микроскопе (положительный фазовый контраст делает бледно-розовые головки трудно различимыми) при увеличении $\times 200$ или $\times 400$.
6. Рассчитайте число окрашенных (мертвые) и неокрашенных (живые) клеток с помощью лабораторного счетчика.
7. Оцените 200 сперматозоидов в каждой аликвоте для того, чтобы достичь приемлемо низкой статистической ошибки (см. Бокс 2.5).
8. Вычислите средние значения живых клеток и различия между ними для двух аликвот.
9. Определите приемлемость различия из табл. 2.1 или рис. А7.2, Приложение 7. (Каждое показывает максимальное различие между двумя процентными значениями, которые, как ожидается, попадут в 95% доверительный интервал.)
10. Если различие между процентными значениями приемлемо, запишите среднее значение живых клеток. Если различие слишком большое, приготовьте две дополнительные аликвоты спермы и повторите оценку (см. Бокс 2.6).
11. Запишите средний процент живых сперматозоидов, округлив его до ближайшего целого числа.

2.6.2.3 Оценка

1. Живые сперматозоиды имеют белые или светло-розовые головки, а мертвые окрашиваются красным или темно-розовым.
2. Если окрашена только часть шейки, а головка остается неокрашенной, считают, что мембрана частично нарушена, но нет признаков гибели клетки и дезинтеграции всей мембраны. Такие клетки следует считать живыми.
3. Если трудно различить границы головки, окрашенной розовым, используйте нигрозин для увеличения контрастности фона (см. Раздел 2.6.1).

2.6.2.4 Минимальное референсное значение

Минимальным референсным значением для жизнеспособности (сперматозоиды с интактной мембраной) принято 58% (5-й перцентиль, 95% доверительный интервал 55–63).

Комментарий: Общее число сперматозоидов с интактной мембраной в эякуляте имеет биологическое значение. Оно получается умножением общего числа сперматозоидов в эякуляте (см. Раздел 2.8.7) на процент клеток с интактной мембраной.

2.6.3 Тест на жизнеспособность с использованием гипоосмотического набухания

Как альтернатива методам с окрашиванием может быть использован тест с гипоосмотическим набуханием (HOS-тест) для определения жизнеспособности.

неспособности сперматозоидов (Jeyendran et al., 1984). Данный метод полезен, когда необходимо избежать окрашивания сперматозоидов, например, при отборе сперматозоидов для ИКСИ. Сперматозоиды с интактными мембранами набухают в течение 5 мин в гипосмотическом растворе, а формы жгутиков стабилизируются к 30 мин (Hossain et al., 1998).

Таким образом, используйте:

- инкубацию в течение 30 мин для рутинной диагностики, но
- инкубацию в течение 5 мин, когда готовите сперматозоиды для терапевтических целей.

2.6.3.1 Приготовление реагентов

1. Раствор для набухания для диагностических целей: растворите 0,735 г дигидрата цитрата натрия и 1,351 г D-фруктозы в 100 мл дистиллированной воды. Заморозьте аликвоты данного раствора по 1 мл при температуре -20°C .
2. Для терапевтических целей: разбавьте среду для использования 1+1 (1:2) стерильной дистиллированной водой.

2.6.3.2 Процедура

1. Получите оттаивание замороженного раствора для набухания и тщательно перемешайте его до использования.
2. Нагрейте 1 мл раствора для набухания или 1 мл разведенного раствора 1+1 (1:2) в закрытой центрифужной пробирке при 37°C в течение 5 мин.
3. Хорошо перемешайте образец спермы (см. Бокс 2.3).
4. Возьмите аликвоту спермы 100 мкл и добавьте раствор для набухания. Аккуратно перемешайте путем пипетирования.
5. Инкубируйте при 37°C в течение строго 5 мин или 30 мин (см. выше), затем переместите аликвоту 10 мкл на чистое предметное стекло и накройте покровным 22×22 мм.
6. Перемешайте образец спермы, наберите повторную аликвоту, смешайте ее с раствором для набухания, инкубируйте и подготовьте еще один препарат, как описано выше.
7. Оцените каждое стекло в фазово-контрастном микроскопе при увеличении $\times 200$ или $\times 400$.
8. Подсчитайте число не набухших (мертвые) и набухших (живые) клеток с помощью лабораторного счетчика.
9. Оцените 200 сперматозоидов в каждой аликвоте для достижения Минимальной статистической ошибки (см. Бокс 2.5).
10. Рассчитайте средний процент живых клеток и различия между аликвотами.
11. Определите приемлемость различия из Табл. 2.1 или Рис. А7.2, Приложение 7. (Каждое показывает максимальное различие между

двумя процентными значениями, которые, как ожидается, попадут в 95% доверительный интервал.)

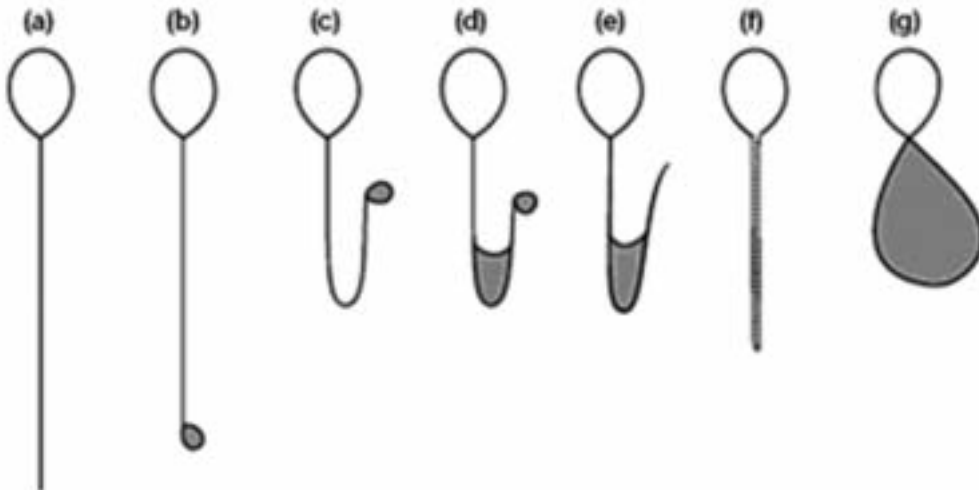
12. Если различие между процентными значениями приемлемо, запишите среднее значение живых клеток. Если различие слишком большое, приготовьте две дополнительные аликвоты спермы и повторите оценку (см. Бокс 2.6).
13. Запишите средний процент живых сперматозоидов, округлив его до ближайшего целого числа.

2.6.3.3 Оценка

1. Набухшие сперматозоиды идентифицируют по изменению формы клетки, по скручиванию жгутика (Рис. 2.6).
2. Живые клетки различают по признакам набухания жгутика сперматозоида; подсчитывают все формы набухания жгутика как живые сперматозоиды.

Рис.2.6 Схематическое изображение типичных морфологических изменений сперматозоида человека при гипоосмотическом стрессе.

(а) Нет изменений. (b)–(g) Различные типы изменений жгутика. Набухание жгутика показано серым цветом.



Воспроизведено из: Jeyendran R. S., Van der Ven H. H., Perez-Pelaez M., Crabo B. G., Zaneveld L. J. D. (1984), *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219–228. © Society for Reproduction and Fertility (1984). Воспроизведено с любезного разрешения.

2.6.3.4 Минимальное референсное значение

Значение HOS-теста практически совпадает со значением теста с зоином (Carreras et al., 1992).

Минимальным референсным значением для жизнеспособности (сперматозоиды с интактной мембраной) принято 58% (5-й перцентиль, 95% доверительный интервал 55–63).

Комментарий: Общее число сперматозоидов с интактной мембраной в эякуляте имеет биологическое значение. Оно получается умножением общего числа сперматозоидов в эякуляте (см. Раздел 2.8.7) на число (в %) клеток с интактной мембраной.

2.7 Определение количества сперматозоидов

Общее число сперматозоидов в эякуляте и концентрация сперматозоидов — параметры, которые связаны как со временем достижения беременности (Slama et al., 2002), так и с эффективностью наступления беременности (WHO, 1996; Zinaman et al., 2000) и прогнозируют зачатие (Bonde et al., 1998; Larsen et al., 2000). Подтверждены многие данные, которые связывают общее число сперматозоидов с репродуктивными исходами. Число сперматозоидов в эякуляте рассчитывают из концентрации сперматозоидов, которую определяют при анализе спермы. В норме при отсутствии обструкции мужского полового тракта и коротком времени полового воздержания общее число сперматозоидов в эякуляте коррелирует с тестикулярным объемом (Handelsman et al., 1984; WHO, 1987; Andersen et al., 2000; Behre et al., 2000) и таким образом есть мера оценки: способности яичек продуцировать сперматозоиды (MacLeod & Wang, 1979), потенции мужского полового тракта. От концентрации сперматозоидов в сперме может зависеть оплодотворение и наступление беременности, она определяется объемом секретов семенных пузырьков и простаты (Eliasson, 1975) и не является особой мерой тестикулярной функции.

Комментарий 1: Термины «общее количество сперматозоидов» и «концентрация сперматозоидов» не являются синонимами. Концентрация сперматозоидов относится к числу клеток на единицу объема эякулята и является функцией количества вырабатываемых сперматозоидов и объема жидкости, в которой они находятся. Общее число сперматозоидов есть суммарное число сперматозоидов во всем эякуляте и его получают умножением концентрации сперматозоидов (в 1 мл) на объем эякулята.

Комментарий 2: Общее правило, что общее количество сперматозоидов отражает тестикулярную функцию их продукции, может не распространяться на эякулят, полученный с помощью электродов, у мужчин с повреждением спинного мозга, при андрогенном дефиците или для образцов после продолжительной абстиненции или при частично ретроградной эякуляции.

Комментарий 3: Термин «плотность сперматозоидов» (масса на единицу объема) не следует использовать, когда подразумевается концентрация сперматозоидов (их число на единицу объема).

Определение числа сперматозоидов состоит из следующих этапов (которые описаны более подробно в последующих разделах).

- Поместите каплю хорошо перемешанного, разжиженного неразведенного эякулята на предметное стекло под покровное для определения

приблизительного разведения и оцените размеры камеры для ее использования (см. Раздел 2.8.1). Обычно это влажный препарат (см. Раздел 2.4.2), используемый для оценки подвижности.

- Смешайте эякулят с подготовленным раствором для фиксации.
- Поместите образец в гемоцитометр и позвольте сперматозоидам распределиться внутри влажной камеры.
- Оцените образец в течение 10–15 мин (после которых испарение будет уже влиять на позицию сперматозоидов внутри камеры).
- Посчитайте не менее 200 сперматозоидов дважды.
- Сравните каждый расчет на близость значений. Если они близки, продолжите вычисления; если нет, подготовьте новые разведения.
- Рассчитайте концентрацию сперматозоидов в мл.
- Рассчитайте общее число сперматозоидов в эякуляте.

2.7.1 Типы камер для подсчета сперматозоидов

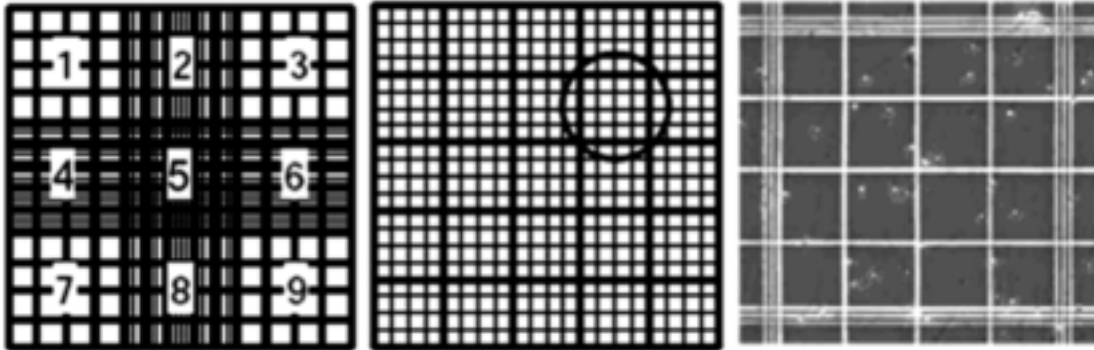
Рекомендовано использовать гемоцитометр глубиной 100 мкм. Ниже приведены степени разведений для усовершенствованного гемоцитометра Нэйбауера. Возможно использовать гемоцитометры другой глубины, однако они будут иметь другие объемы и внутренние сетки, что потребует других множителей для вычислений. Существуют другие камеры для вычисления концентрации сперматозоидов (Seaman et al., 1996; Mahmoud et al., 1997; Brazil et al., 2004b), однако они могут давать результаты, отличные от усовершенствованного гемоцитометра Нэйбауера. Неглубокие камеры, которые заполняются путем капиллярных сил, могут не иметь равномерного распределения сперматозоидов из-за текучести (Douglas-Hamilton et al., 2005a, 2005b). Это можно скорректировать (Douglas-Hamilton et al., 2005a), однако это необоснованно (Björndahl & Barratt, 2005). Правильность таких альтернативных расчетных камер должна быть установлена с помощью проверки размера (см. Приложение 7, Раздел A7.8) при его сравнении с усовершенствованным гемоцитометром Нэйбауера и для получения удовлетворительной характеристики, как показано в программе внешнего контроля качества. Для точной оценки при низких значениях концентрации сперматозоидов может потребоваться расчетная камера большего объема (см. Раздел 2.11.2).

2.7.2 Усовершенствованный гемоцитометр Нэйбауера

Усовершенствованный гемоцитометр Нэйбауера имеет две независимые расчетные камеры, каждая из которых содержит микроскопическую сетку 3×3 мм, нанесенную на поверхность стекла. Камеру используют со специальным тонким покровным стеклом (толщина номер 4; 0,44 мм), которым накрывают сетку, что обеспечивает пространство (столб) толщиной 0,1 мм над поверхностью стекла. Каждая расчетная область поделена на 9 квадратов 1×1 мм. Эти квадраты пронумерованы числами (см. Рис. 2.7).

Рис. 2.7 Усовершенствованный гемоцитометр Нэйбауера.

Показаны: все девять квадратов в одной камере гемоцитометра (левый рисунок); центральная сетка (номер 5) из 25 квадратов (центральный рисунок); и микрофотография части заполненной камеры (правый рисунок); показан один из 25 квадратов центральной сетки (обведенная область на центральном рисунке), окруженный тройными линиями и содержащий 16 малых квадратов.



Микрофотография любезно предоставлена С. Brazil.

При глубине камеры 100 мкм, каждый большой квадрат составляет 100 нл. Четыре из этих больших квадратов (номера 1, 3, 7 и 9) содержат четыре столбца по четыре малых квадрата по 6,25 нл; два больших квадрата (номера 2 и 8) содержат четыре ряда по пять квадратов по 5 нл; два больших квадрата (номера 4 и 6) содержат пять рядов по четыре малых квадрата по 4 нл (Рис. 2.7, центральная панель). Каждый из 25 малых квадратов центрального большого квадрата (номер 5) подразделен на 16 более мелких квадратов (Рис. 2.7, правая панель). Таким образом, большие квадраты 1, 2, 3, 7, 8 и 9 имеют четыре ряда по 25 нл на строку, при этом квадраты 4, 5 и 6 имеют пять рядов по 20 нл в каждом. В зависимости от разведения и числа рассчитываемых сперматозоидов различные области камеры используют для определения концентрации сперматозоидов. Для разведений 1+19 (1:20) и 1+4 (1:5) оценивают ряд из большого квадрата номер 5, а затем, если необходимо, из больших квадратов 4 и 6 (см. Раздел 2.8). При разведении 1+1 (1:2) все девять квадратов могут быть проанализированы, если необходимо посчитать 200 сперматозоидов (см. Раздел 2.11.1).

2.7.3 Использование сетки гемоцитометра

- Подсчитывайте только целые сперматозоиды (с головками и жгутиками).
- Определяйте, подсчитан или нет сперматозоид по локализации его головки; ориентация его жгутика неважна. Границы квадрата определяйте по средней линии из трех; таким образом сперматозоиды подсчитывают, если большая часть головки находится между двумя внутренними линиями, и не считают, если большая часть головки располагается между двумя внешними линиями (Рис. 2.8, левая панель).
- Избегайте подсчета одних и тех же сперматозоидов в соседних квадратах, сперматозоиды, чья головка лежит на границе двух квадратов, следует подсчитывать только, если линия является одной из двух перпендикулярных пограничных линий. Например, клетки можно подсчи-

тывать, если большинство головок сперматозоидов лежит ниже или левее центральной пограничной линии, которая формирует фигуру «L» (см. Рис. 2.8, средняя панель), и не считать, если они лежат выше или правее пограничной линии (Рис. 2.8, правая панель).

Важно: Если присутствует много сперматозоидов без головок (ацефалические) или головок без жгутиков, это следует указать. Если обоснована необходимость, их концентрация может быть определена аналогично тому, как подсчитывают целые сперматозоиды (см. Раздел 2.8) или их процентное содержание относительно целых сперматозоидов можно определить на окрашенных препаратах (см. Раздел 2.17.6).

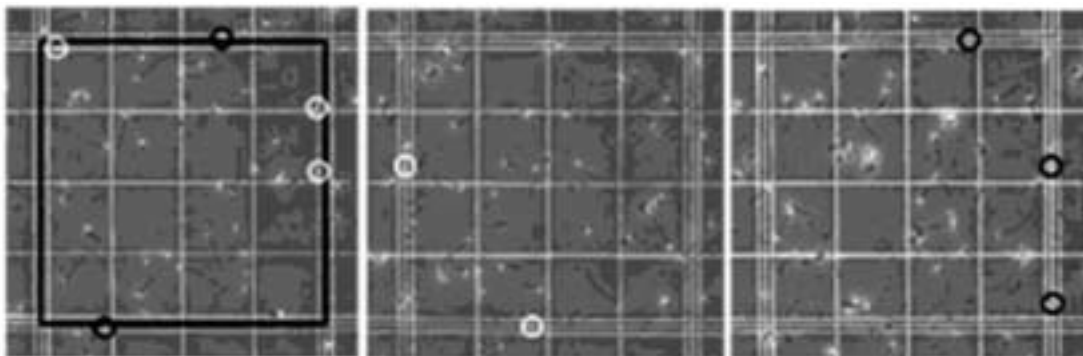
2.7.4 Уход за счетной камерой

Расчетная камера гемоцитометра должна быть использована только со специальными тонкими покровными стеклами (толщина номер 4; 0,44 мм).

- Вымойте камеру гемоцитометра и покровное стекло водой и хорошо просушите тканью после использования, так как любые остатки могут задерживаться в камере. Протирание поверхности сетки удалит все оставшиеся сперматозоиды из предыдущего образца спермы.
- Замочите камеры и покровные стекла на ночь в дезинфицирующем растворе (см. Приложение 2, Раздел А 2.4) для избежания контаминации потенциально опасными инфекциями, находящимися в сперме.

Рис. 2.8 Сперматозоиды для расчета в квадратах.

Средняя из трех линий определяет границы квадрата (черная линия, левый рисунок). Подсчитывают все сперматозоиды внутри центрального квадрата, а также сперматозоиды, чьи жгутики находятся между двумя внутренними линиями (белые окружности), но не те клетки, головки которых располагаются между двумя внешними линиями (черные окружности). Сперматозоид, если большая часть его головки лежит на центральной линии, подсчитывают в случае, если эта линия находится ниже или левее квадрата (белые окружности, средний рисунок), но не выше или не справа квадрата (черные окружности, правый рисунок).



Микрофотография любезно предоставлена С. Brazil.

2.7.5 Фиксация разведенного образца спермы

1. Растворите 50 г бикарбоната натрия (NaHCO_3) и 10 мл 35% (v/v) формалина в 1000 мл дистиллированной воды.
2. Если необходимо, добавьте 0,25 г трипанового голубого (цветовой индекс 23859) или 5 мл насыщенного (>4 мг/мл) фиолетового (цветовой индекс 42555) для большего высвечивания головок сперматозоидов.
3. Храните при 4°С. Если в растворе формируются кристаллы, профильтруйте его через фильтр 0,45 мкм до использования.

2.7.6 Важность подсчета достаточного количества сперматозоидов

Для снижения статистических ошибок должно быть подсчитано достаточное количество сперматозоидов (предпочтителен подсчет не менее 400 сперматозоидов, при двукратном подсчете по 200 клеток) (см. Бокс 2.7 и Табл. 2.2).

Бокс 2.7 Стандартная ошибка при оценке концентрации сперматозоидов

Точность оценки концентрации сперматозоидов зависит от числа подсчитанных клеток. При распределении Пуассона стандартная ошибка (SE) рассчитанного числа N равна квадратному корню из N (\sqrt{N}), а 95% доверительный интервал (CI) для числа сперматозоидов в объеме эякулята составит приблизительно $N \pm 1,96 \sqrt{N}$ (или приблизительно $N \pm 2 \times \sqrt{N}$).

Если подсчитано 100 сперматозоидов, то средняя квадратичная ошибка составит $10(\sqrt{100})$, а 95% доверительный интервал — 80–120 (100 ± 20). Если подсчитано 200 половых клеток, средняя квадратичная ошибка будет 14 ($\sqrt{200}$), 95% доверительный интервал — 172–228 (200 ± 28). Если подсчитано 400 сперматозоидов, SE составит 20 ($\sqrt{400}$), а 95% доверительный интервал — 360–400 (400 ± 40).

Ошибка выборки может быть выражена в процентах ($100 \times \sqrt{N}/N$). Средние квадратичные ошибки в зависимости от числа подсчитанных клеток показаны в Табл. 2.2.

Важно. Эти значения являются приблизительными, так как доверительные интервалы не всегда симметричны относительно оцениваемого значения. Точный 95% доверительный интервал, исходя из характеристик распределения Пуассона, равен 361–441 при подсчете 400 клеток, 81,4–121 для 100 клеток, 4,8–18,4 при расчете 10 клеток, 0,03–5,57 для 1 сперматозоида и 0–3,7 для 0.

Таблица 2.2 Округленные значения стандартной ошибки (%) согласно числу подсчитанных сперматозоидов

Число сперматозоидов (N)	Стандартная ошибка (%)	Число сперматозоидов (N)	Стандартная ошибка (%)	Число сперматозоидов (N)	Стандартная ошибка (%)
1	100	5	20	85	10,8
2	70,7	30	18,3	90	10,5
3	57,7	35	16,9	95	10,3
4	50	40	15,8	100	10
5	44,7	45	14,9	150	8,2
6	40,8	50	14,1	200	7,1
7	37,8	55	13,5	250	6,3
8	35,4	60	12,9	300	5,8
9	33,3	65	12,4	350	5,3
10	31,6	70	12	400	5
15	25,8	75	11,5	450	4,7
20	22,4	80	11,2	500	4,5

Комментарий 1: Подсчет слишком малого числа сперматозоидов приведет к недостоверному результату (см. Приложение 7, Раздел А7.1), который может повлиять на диагноз и лечение (см. Приложение 7, Раздел А7.2). Этого нельзя избежать, когда сперматозоиды анализируют для терапевтических целей и их число слишком мало (см. Раздел 5.1).

Комментарий 2: Когда объем эякулята недостаточен и подсчитано число сперматозоидов меньше рекомендуемого значения, точность полученной оценки будет значительно снижена. Если подсчитывают менее 200 сперматозоидов на повтор, размер статистической ошибки следует брать из Табл. 2.2.

2.8 Рутинная процедура подсчета сперматозоидов

Разведения 1+4 (1:5) и 1+19 (1:20) подходят для расчета концентрации сперматозоидов, при этом около 200 сперматозоидов располагаются в одном квадрате или в квадратах под номерами 4, 5 и 6 гемоцитометра (см. Табл. 2.3 и Бокс 2.8).

Бокс 2.8 Достижение 200 сперматозоидов на повтор в центральных трех квадратах усовершенствованного гемоцитометра Нэйбауера

Если присутствует 100 сперматозоидов при микроскопии с высоким разрешением (МВР) на поле зрения 4 нл (см. Бокс 2.9) при первоначальной оценке влажного препарата, теоретически их число в нл равно 25 (25 000 на мкл или 25 000 000 в мл). Так как центральный квадрат (номер 5) усовершенствованного гемоцитометра Нэйбауера имеет объем 100 нл, внутри него должно присутствовать 2500 сперматозоидов. Разведение образца 1+4 (1:5) следует уменьшить для достижения числа сперматозоидов примерно 500 на квадрат, что достаточно для получения приемлемо низкой ошибки расчета.

Если в поле зрения влажного препарата при МВР присутствует 10 сперматозоидов, их число в нл составляет 2,5 и 250 в центральном квадрате. Разведение образца 1+1 (1:2), как предполагают, даст 125 сперматозоидов на квадрат; это даст 375 клеток в трех квадратах под номерами 4, 5 и 6 и приведет к приемлемо низкой ошибке расчета.

Важно: Такие расчетные концентрации дают только грубую оценку, так как подсчитано небольшое число сперматозоидов, а также может быть не точным объем эякулята. Концентрации, оцениваемые на неразбавленных препаратах, могут колебаться от 30% до 130% концентраций разбавленных образцов в расчетных камерах.

2.8.1 Определение требуемого разведения

Необходимое разведение спермы, позволяющее точно измерить число сперматозоидов, рассчитывают при оценке неразведенного эякулята. Обычно это влажный препарат (см. Раздел 2.4.2), используемый для оценки подвижности.

- Оцените один из влажных препаратов, подготовленных по методике, описанной в Разделе 2.4.2, для оценки числа сперматозоидов при микроскопии с высоким разрешением (МВР) ($\times 200$ или $\times 400$).
- Одно поле зрения при МВР приблизительно эквивалентно 16 нл (при $\times 200$) и 4 нл (при $\times 400$) (см. Бокс 2.9).
- Если сперматозоиды присутствуют, подсчитайте их, определяя необходимое разведение из Табл. 2.3 и продолжайте процедуру, как описано в Разделе 2.8.2.
- Если ни одного сперматозоида не обнаружено, оцените еще один влажный препарат. Если в повторном препарате сперматозоиды также отсутствуют, продолжайте работу, как описано в Разделе 2.9.

Бокс 2.9 Объем спермы, наблюдаемый на поле зрения при микроскопии с высоким разрешением (МВР) при оценке влажного препарата глубиной 20 мкм

Объем спермы, наблюдаемый на поле зрения, зависит от величины оцениваемой области (πr^2 , где π приблизительно равен 3,142, а r — радиус поля зрения микроскопа) и глубины камеры (20,7 мкм для влажного препарата). Диаметр поля зрения микроскопа можно измерить с помощью микрометра предметного столика или оценить делением диаметра апертуры окуляра на увеличение объектива.

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

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

Таблица 2.3 Требуемые разведения спермы, исходя из используемой камеры и оцениваемого поля зрения

Число сперматозоидов на поле зрения при увеличении $\times 400$	Число сперматозоидов на поле зрения при увеличении $\times 200$	Необходимое разведение	Сперма (мкл)	Фиксатор (мкл)	Камера	Область подсчета
>101	>404	1:20 (1 + 19)	50	950	Усовершенствованный гемоцитометр Нэйбауера	Квадраты 5, 4, 6
16–100	64–400	1:5 (1 + 4)	50	200	Усовершенствованный гемоцитометр Нэйбауера	Квадраты 5, 4, 6
2–15	8–60	1:2 (1 + 1)	50	50	Усовершенствованный гемоцитометр Нэйбауера	Квадраты 5, 4, 6
<2	<8	1:2 (1 + 1)	50	50	Усовершенствованный гемоцитометр Нэйбауера или весь объем препарата	Все 9 квадратов или все стекло

Важно 1: Пипетки для лейкоцитов и автоматические пипетки с воздушным замещением не пригодны для точного разведения эякулята с повышенной вязкостью; используйте пипетки с положительным замещением.

Важно 2: Для диагностических целей образцы эякулята для анализа не следует использовать меньше 50 мкл для того, чтобы избежать ошибок пипетирования, связанных с малыми объемами.

Важно 3: Если в поле зрения присутствует слишком мало сперматозоидов при рекомендованном разведении, приготовьте другой препарат с меньшим разведением. Если слишком много сперматозоидов (клетки накладываются друг на друга) в поле зрения, приготовьте препарат с большим разведением.

Важно 4: Если разведение 1+19 (1:20) не удовлетворительное, используйте 1+49 (1:50).

Комментарий 1: Если число сперматозоидов при первичной оценке влажного препарата низкое (<4 на поле зрения при $\times 400$: приблизительно 1×10^6 /мл), точное число сперматозоидов может не требоваться (см. Раздел 2.10).

Комментарий 2: Для точной оценки низкой концентрации сперматозоидов (<2 на поле зрения при $\times 400$: $<0,5 \times 10^6$ /мл), рекомендуется использовать все девять квадратов усовершенствованного гемоцитометра Нэйбайера (см. Раздел 2.11.1) или одноразовую камеру большего объема с флуоресцентной микроскопией (см. Раздел 2.11.2).

2.8.2 Разведение и наполнение камеры гемоцитометра

- Увлажните поверхность гемоцитометра, слегка подышав на нее.
- Закрепите (притрите) покровное стекло на расчетной камере, с усилием надавив им на основание камеры. Появление радужности (составные кольца Ньютона) между двумя стеклами подтверждает правильную позицию покровного стекла. Чем больше видно колец, тем лучше крепление стекла; только одна или две линии могут указывать на проблемы с величиной глубины камеры.
- Используйте пипетки с положительным замещением для добавления нужного количества фиксатора (см. Табл. 2.3) в две виалы для разведения.
- Хорошо перемешайте образец (см. Бокс 2.3).
- Аспирируйте подходящий объем эякулята сразу после перемешивания, не позволяя сперматозоидам осесть (см. Табл. 2.3).
- Аккуратно удалите сперму вне кончика пипетки, не прикасаясь к открытому концу.
- Добавьте сперму в фиксатор и промойте наконечник пипетки в фиксаторе аспирированием.
- Снова хорошо перемешайте образец эякулята и приготовьте повторный препарат согласно шагам, описанным выше.
- Тщательно перемешайте первый препарат на вортексе в течение 10 сек на максимальной скорости. Сразу же аспирируйте примерно 10 мкл суспензии во избежание оседания сперматозоидов.
- Прикоснитесь кончиком пипетки к нижнему краю одной из камер с V-образным желобком.
- Медленно нажимайте на поршень пипетки, заполняя камеру за счет капиллярных сил. Покровное стекло не нужно удалять во время наполнения камеры, а камеру не следует переполнять (иначе покровное стекло можно легко снять) или заполнять не полностью (когда внутри остаются воздушные полости)
- Перемешайте второй препарат, как описано выше, и сразу же возьмите аликвоту 10 мкл. Заполните вторую камеру гемоцитометра, как описано выше.
- Подержите гемоцитометр горизонтально в течение 4 мин при комнатной температуре во влажной камере (например влажная фильтровальная бумага в закрытой чашке Петри) для предотвращения высыхания. Неподвижные клетки за это время будут осаждаться на сетки.

Важно 1: Некоторые камеры сконструированы со стеклянными основаниями; в них не появляются кольца Ньютона. Применяйте около 1,5 мкл воды для каждого основания для удержания покровного стекла на месте (Brazil et al., 2004a), контролируя отсутствие попадания воды в расчетное поле.

Важно 2: Используйте крепеж гемоцитометра для удержания покровного стекла и гарантии постоянства объема (Christensen et al., 2005).

Важно 3: При очень большой вязкости сперматозоиды могут агрегировать внутри жидкости разведения, если перемешивание отложено на 5–10 сек. В таких случаях перемешайте разведенный образец в течение 10 сек сразу же после добавления фиксатора в эякулят.

2.8.3 Оценка числа сперматозоидов в расчетных камерах

Следует оценивать число сперматозоидов в обеих камерах гемоцитометра. Если два значения приблизительно равны, аликвоту можно считать репрезентативной (см. Раздел 2.4.1).

- Оцените гемоцитометр в фазово-контрастном микроскопе при увеличении $\times 200$ или $\times 400$.
- Подсчитайте не менее 200 сперматозоидов в каждой аликвоте для достижения приемлемо низкой ошибки расчета (см. Бокс 2.7 и Табл. 2.2).
- Первым оценивайте центральный квадрат (номер 5 на Рис. 2.7) с одной стороны усовершенствованной камеры Нэйбауера ряд за рядом.
- Продолжайте подсчет, пока не достигните 200 сперматозоидов, и оцените весь ряд (пять больших квадратов). Расчет должен быть произведен на полном ряду; не останавливайтесь в середине ряда. Если не достигнуто 200 сперматозоидов в пяти рядах центрального квадрата, продолжите подсчет в рядах (4 большие клетки) в соседних квадратах (номера 4 и 6 на Рис. 2.7).
- Запишите число рядов, при котором число подсчитанных сперматозоидов достигло 200. То же самое число рядов будет оценено в другой камере гемоцитометра.
- Производите подсчет числа сперматозоидов и рядов с помощью лабораторного счетчика.
- Настройте вторую камеру гемоцитометра и выполните повторный расчет того же числа рядов (тот же объем), что и в первом вычислении, даже если поля зрения содержат менее 200 клеток.
- Вычислите сумму и различие двух подсчетов.
- Определите приемлемость различия из Табл. 2.4 или Рис. А 7.1, Приложение 7. (Каждое показывает максимальное различие между двумя значениями, которые, как ожидается, попадут в 95% доверительный интервал.)
- Если различие между значениями приемлемо, рассчитайте концентрацию (см. Раздел 2.8.4). Если различие слишком большое, приготовьте два новых разведения, как описано в Разделе 2.8.2 и повторите подсчет (см. Бокс 2.10).
- Запишите среднее значение концентрации сперматозоидов, округлив его до двух значимых цифр.
- Рассчитайте общее число сперматозоидов в эякуляте (см. Раздел 2.8.7).

Важно 1: Если менее 200 сперматозоидов найдено в квадратах 4, 5 и 6, не следует продолжать подсчеты в квадратах 1, 2, 3, 7, 8 или 9, так как объемы каждого ряда отличаются друг от друга (см. Раздел 2.7.2). В таком случае подготовьте и оцените образец при меньшем разведении. Если необходимо разведение 1+1 (1:2), делайте как описано в Разделе 2.11.

Важно 2: Оценивать одну и ту же камеру дважды и оценивать обе камеры с одинаковым разведением — не одно и то же, так как первое не позволяет обнаружить ошибки выборки, перемешивания и разведения.

Таблица 2.4 Приемлемые различия суммы, полученной двумя последовательными подсчетами

Сумма	Приемлемое различие*	Сумма	Приемлемое различие*
144–156	24	329–346	36
157–169	25	347–366	37
170–182	26	367–385	38
183–196	27	386–406	39
197–211	28	407–426	40
212–226	29	427–448	41
227–242	30	449–470	42
243–258	31	471–492	43
259–274	32	493–515	44
275–292	33	516–538	5
293–309	34	539–562	46
310–328	35	563–587	47

*На основании округленного 95% доверительного интервала.

Бокс 2.10 Сравнение повторных подсчетов

Различие между независимыми подсчетами, как ожидается, равно 0 при стандартной ошибке, равной корню квадратному от суммы двух подсчетов. Таким образом, значение $(N1-N2)/(\sqrt{N1+N2})$ будет $< 1,96$ только за счет случайности 95% доверительного предела.

Если различие между подсчетами меньше, либо равно значению, указанному в Табл. 2.4 или 2.5 для полученной суммы, оценки приемлемы, а концентрация рассчитывается из этих средних значений. Большее различие предполагает, что произошло неправильное вычисление или существуют ошибки пипетирования, или клетки не были перемешаны, что привело к неслучайному распределению их в камере или на предметном стекле.

Когда различие между подсчетами больше допустимого, отбросьте первые два значения и приготовьте и оцените два новых образца разведенной спермы (не подсчитывайте третий образец и не рассчитывайте среднее из трех значений или не вычисляйте среднее двух близких цифр).

Такой подход используют при расчете сперматозоидов и пероксидаза-положительных клеток (см. Раздел 2.18). Для CD45-положительных

клеток (см. Раздел 3.2) и незрелых половых клеток (см. Раздел 2.19) окрашенные препараты следует подсчитать еще раз. При таком 95% доверительном интервале получаемых пороговых (cut-off) значений приблизительно 5% их повторов будут оказываться вне минимальных референсных значений за счет случайности.

Важно: В некоторых редких случаях, с неоднородными образцами, даже третий подсчет может давать неприемлемые различия. В этом случае рассчитайте среднее значение всех повторных вычислений и запишите это в отчете.

2.8.4 Вычисление концентрации сперматозоидов в эякуляте

Рекомендуют вычислять и выдавать в отчете концентрацию сперматозоидов в эякуляте. Хотя концентрация не отражает тестикулярную функцию, она связана с оплодотворением и частотой наступления беременности.

Концентрация сперматозоидов в эякуляте — число сперматозоидов (N), разделенное на объем, в котором подсчитано данное число клеток, то есть объем общего числа оцененных рядов (n) для повторных измерений (20 нл каждый квадрат 4, 5 и 6), умноженный на фактор разведения. То есть $C = (N/n) \times (1/20) \times \text{фактор разведения}$.

При разведении 1+4 (1:5), используя квадраты 4, 5 и 6, концентрация $C = (N/n) \times (1/20) \times 5$ сперматозоидов на нл = $(N/n) \times (1/4)$ сперматозоидов/нл (или 10^6 на мл спермы).

При разведении 1+19 (1:20), используя квадраты 4, 5 и 6, концентрация $C = (N/n) \times (1/20) \times 20$ сперматозоидов на нл = (N/n) сперматозоидов/нл (или 10^6 на мл спермы).

При разведении 1+49 (1:50), используя квадраты 4, 5 и 6, концентрация $C = (N/n) \times (1/20) \times 50$ сперматозоидов на нл = $(N/n) \times 2,5$ сперматозоидов/нл (или 10^6 на мл спермы).

2.8.5 Примеры с решениями

Пример 1. При разведении 1+19 (1:20) при первом подсчете обнаружен 201 сперматозоид в семи рядах, при втором подсчете — 245 сперматозоидов в семи рядах. Сумма значений (201+245) равна 446 в 14 рядах, различие (245–201) составляет 44. Из Табл. 2.4 видим, что оно превышает допустимое значение (41), результаты признаны непригодными, следует повторить разведение и расчет.

Пример 2. При разведении 1+19 (1:20) при первом подсчете получено 220 сперматозоидов в четырех рядах, при втором — 218 сперматозоидов в четырех рядах. Сумма значений (220+218) составляет 438 в восьми рядах, разница (220–218) равна 2. Из Табл. 2.4 видим, что разница меньше ожидаемой (41), таким образом значения признаны годными. Концентрация препарата при разведении 1+19 (1:20) равна $C = (N/n) \times 1,0$ сперматозоидов в нл, то есть $(438/8) \times 1,0 = 54,75$ сперматозоидов/нл, или 55×10^6 сперматозоидов в мл эякулята (округление до двух значимых цифр).

Важно: При разведении 1+19 (1:20) и использовании квадратов 4, 5 и 6 концентрацию просто подсчитать. Общее число сперматозоидов, подсчитанное делением на общее число оцененных рядов, равно концентрации сперматозоидов в 10^6 /мл. В примере выше расчет — $(220 + 218)/(4+4) = 438/8 = 55 \times 10^6$ сперматозоидов в мл эякулята.

Пример 3. При разведении 1+19 (1:20) при первом расчете обнаружено содержание 98 сперматозоидов в 15 рядах (квадраты 5, 4 и 6), при втором — 114 сперматозоидов в 15 рядах (квадраты 5, 4 и 6). Сумма значений (98+114) равна 212 в 30 рядах, разница (114–98) составляет 16. Из Табл. 2.4. видим, что она меньше ожидаемой (29), результат признан годным.

Концентрация образца при разведении 1+19 (1:20) равна $C = (N/n) \times 1,0$ сперматозоидов в нл или $(212/30) \times 1,0 = 7,07$ сперматозоидов/нл, или $7,1 \times 10^6$ сперматозоидов в мл эякулята (округление до двух значимых цифр). Так как подсчитано менее 400 сперматозоидов, в отчете указывается ошибка расчета для 212 сперматозоидов из Табл. 2.2. (приблизительно 7%).

Важно: В данном примере образцы разведены слишком сильно, так как менее 200 сперматозоидов обнаружено в квадратах 5, 4 и 6; следует применить разведение 1+4 (1:5).

Пример 4. При разведении 1+4 (1:5) при первом расчете обнаружено 224 сперматозоида в четырех рядах, при втором — 268 сперматозоидов в четырех рядах. Сумма значений (224+268) равна 492 в восьми рядах, разница (268–224) 44. Из Табл. 2.4 видим, что разница превышает ожидаемое значение (43), следует сделать новое разведение.

Пример 5. При разведении 1+4 (1:5) первый расчет обнаружил 224 сперматозоида в восьми рядах, второй — 213 сперматозоидов в восьми рядах. Сумма значений (224+213) равна 437 в 16 рядах, разница (224–213) равна 11. Из Табл. 2.4 видим, что разница меньше ожидаемого значения (41), результаты признаны годными. Концентрация при разведении 1+4 (1:5) равна $C = (N/n) \times (1/4)$ сперматозоидов в нл, или $(437/16)/4 = 6,825$ сперматозоидов/нл, или $6,8 \times 10^6$ сперматозоидов/мл (округление до двух значимых цифр).

Важно: При разведении 1+4 (1:5) концентрацию также просто вычислить, общее число сперматозоидов поделить на общее число оцененных рядов и делить на 4. Для примера выше расчет — $((224+213)/(8+8))/4 = (437/16)/4 = 27,3/4 = 6,8 \times 10^6$ сперматозоидов в мл эякулята.

2.8.6 Минимальное референсное значение для концентрации сперматозоидов

Минимальным референсным значением для концентрации сперматозоидов принято значение 15×10^6 сперматозоидов на мл (5-й процентиль, 95% CI $12-16 \times 10^6$).

2.8.7 Вычисление общего числа сперматозоидов в эякуляте

Рекомендуют вычислять и записывать общее число сперматозоидов в эякуляте, так как этот параметр выражает способность яичек продуцировать сперматозоиды и потенцию мужского репродуктивного тракта. Значение получают умножением концентрации сперматозоидов на объем всего эякулята.

2.8.8 Минимальное референсное значение общего числа сперматозоидов

Минимальным референсным значением для общего числа сперматозоидов принято 39×10^6 сперматозоидов на эякулят (5-й перцентиль, 95% CI $33\text{--}46 \times 10^6$).

2.9 Низкое число сперматозоидов: криптозооспермия и предполагаемая азооспермия

Если ни одного сперматозоида не обнаружено при повторных оценках влажных препаратов, можно предполагать азооспермию. Несмотря на то, что определение (термин) азооспермии следует изменить (Sharif, 2000; Ezeh & Moore, 2001), данный термин до сих пор описывает эякулят, а не состояние и его происхождение или основу для диагноза и лечения. В общем случае допускают, что термин азооспермия может быть использован только, если ни одного сперматозоида не обнаружено в осадке эякулята после центрифугирования (Eliasson, 1981).

Однако следует иметь в виду следующее:

- так или иначе, обнаружение сперматозоидов в осадке зависит от силы и времени центрифугирования (Lindsay et al., 1995; Jaffe et al., 1998) и от того, какой объем осадка был оценен;
- центрифугирование при 3000 g в течение 15 мин не осаждают все сперматозоиды из образца (Corea et al., 2005); и
- после центрифугирования может быть утрачена подвижность сперматозоидов (Mortimer, 1994a), а концентрация будет переоценена (Cooper et al., 2006).

Дальнейшие действия относительно этого образца зависят от степени субъективности данных в настоящий момент и подвижность сперматозоида является удовлетворительной (см. Раздел 2.10) или точное число сперматозоидов необходимо (см. Раздел 2.11).

2.10 Случаи, когда не требуется точная оценка низкого числа сперматозоидов

Если число сперматозоидов при МВР при первоначальной оценке влажного препарата низкое (от 0 до 4 на поле зрения при $\times 400$ или от 0 до 16 при $\times 200$), выполняйте следующее.

2.10.1 Не производить никаких дальнейших действий

Если число сперматозоидов на поле зрения при $\times 400 < 4$ (то есть $< \text{приблизительно } 1 \times 10^6/\text{мл}$), для большинства клинических целей достаточно записать концентрацию сперматозоидов как $< 2 \times 10^6/\text{мл}$ (учитывать высокую ошибку расчета, связанную с малым количеством подсчитанных сперматозоидов), отметив, присутствуют ли подвижные сперматозоиды.

2.10.2 Оценка образцов спермы после центрифугирования для обнаружения сперматозоидов

Когда не обнаружено ни одного сперматозоида в двух влажных препаратах, образец следует центрифугировать для определения наличия сперматозоидов во всем эякуляте.

- Хорошо перемешайте образец спермы (см. Бокс 2.3). Если сперма имеет повышенную вязкость, ее можно снизить, как описано в Разделе 2.3.1.1.
- Возьмите аликвоту 1 мкл (мл) и центрифугируйте ее при 3000 г в течение 15 мин.
- Слейте большую часть супернатанта и ресуспендируйте осадок со сперматозоидами в оставшейся семенной плазме объемом приблизительно 50 мкл.
- Поместите одну аликвоту осадка 10 мкл на каждое из двух предметных стекол размером 22×22 мм, что создаст влажные препараты глубиной приблизительно 20 микром (см. Бокс 2.4).
- Оцените предметные стекла в фазово-контрастном микроскопе при увеличении $\times 200$ или $\times 250$.
- Оценивайте все покровное стекло методично поле за полем. Начните с одного угла и двигайтесь вдоль оси X к противоположной стороне; затем переместитесь на одно поле зрения вдоль оси Y и двигайтесь в противоположном направлении вдоль всей ширины препарата. Продолжайте зигзагообразное движение, что позволит полностью методично оценить всю аликвоту (см. Рис. 2.9). Удерживайте предметное стекло в объектив при смене полей зрения.
- При объективе $\times 20$ и окуляре $\times 10$ с апертурой 20 мм поле зрения микроскопа имеет диаметр приблизительно 1000 мкм (см. Бокс 2.9). Поэтому под покровным стеклом размером 22×22 мм находится приблизительно 484 поля зрения (22×22) для оценки.
- Присутствие сперматозоидов в любом препарате указывает на криптозооспермию.
- Отсутствие сперматозоидов в обоих препаратах дает основание предполагать азооспермию.

Важно 1: Большинство настольных центрифуг с 15 мл стаканами не способны достигать 3000 г: используйте высокоскоростную центрифугу со стаканами 1,5–2,0 мл. Убедитесь, что образец спермы хорошо перемешан до взятия аликвоты.

Важно 2: Оценка препарата займет не менее 10 мин, так как образец имеет большое число полей зрения для анализа.

Важно 3: При центрифугировании образцов для ВРТ весь объем эякулята или большая часть осадка (например, четыре аликвоты по 10 мкл) могут быть необходимы для анализа и поиска живых сперматозоидов.

Комментарий 1: Отсутствие подвижных сперматозоидов в оцениваемой аликвоте не обязательно значит отсутствие таковых в оставшемся образце.

Комментарий 2: Так как центрифугирование осаждает не все сперматозоиды, данный метод нельзя использовать для определения общего количества сперматозоидов в эякуляте. Для расчета см. Разделы 2.11.1 или 2.11.2.

2.10.3 Оценка не центрифугированных образцов для обнаружения подвижных сперматозоидов

Когда нужно найти живые сперматозоиды (например, у пациентов после вазэктомии), разведение образца в фиксаторе или высокоскоростное центрифугирование сперматозоидов необходимо избегать. В этом случае нужно оценивать аликвоту только неразведенного эякулята.

- Хорошо перемешайте образец (см. Бокс 2.3).
- Возьмите аликвоту 40 мкл и поместите под покровное стекло размером 24 × 50 мм. Получится препарат глубиной 33 мкм (см. Бокс 2.4).
- Оцените покровное стекло в фазово-контрастном микроскопе при увеличении ×200 или ×250.
- Анализируйте все предметное стекло систематически, поле за полем. Начните с одного угла и двигайтесь вдоль оси X на противоположную сторону; затем продвиньтесь на одно поле по оси Y и сканируйте препарат в другую сторону по всей ширине. Продолжайте двигаться в форме зигзага для полной и систематической оценки всей аликвоты (см. Рис. 2.9). Удерживайте предметное стекло при смене полей зрения.
- При объективе ×20 и окуляре ×10 с апертурой 20 мм поле зрения микроскопа имеет диаметр приблизительно 1000 мкм (см. Бокс 2.9). Таким образом, будет оценено приблизительно 1200 полей зрения (24 × 50) на покровное стекло размером 24 × 50 мм.

Важно: Данная процедура займет не менее 10 мин, так как образец будет иметь много полей зрения.

Комментарий: Отсутствие подвижных сперматозоидов в оцениваемой аликвоте не обязательно значит их отсутствие в оставшейся части эякулята.

Рис. 2.9 Изучение по всей площади покровного стекла на присутствие подвижных сперматозоидов.

Оценивают приблизительно 1200 полей зрения (см. по горизонтали) при увеличении $\times 200$ с использованием покровного стекла размером 24×50 мм и приблизительно 484 полей зрения (см. по вертикали) при увеличении $\times 200$ для покровного стекла 22×22 мм.



2.11 Случаи, когда требуется точная оценка низкой концентрации сперматозоидов

Данный раздел описывает методы определения низкой концентрации сперматозоидов, когда необходимо избежать центрифугирования. Альтернативой осаждению сперматозоидов служит использование низкого разведения спермы и оценка ее больших объемов.

Точность 20% считают приемлемой, когда работают с нижними пределами вычисления (НПВ) (*lower limits of quantification, LLQ*) (Shah et al., 2000). Оценка центрального квадрата (номер 5 на Рис. 2.7) в улучшенной камере Нэйбауера при разведении 1+1 (1:2) теоретически может определить концентрацию 250 000 сперматозоидов в мл с ошибкой расчета 20%. Когда оценивают все девять квадратов, можно определить не менее 27 800 сперматозоидов на мл. Одноразовые камеры большого объема по 25 мкл можно использовать для измерения концентрации 1000 сперматозоидов на мл с той же ошибкой расчета (Cooper et al., 2006).

Как рекомендовано здесь, при разведении эякулята 1+1 (1:2) эти значения коррелируют с концентрацией сперматозоидов в неразбавленной сперме 500 000 на мл, 55 600 на мл и 2000 на мл, соответственно. Однако образцы эякулята, разведенные до такой концентрации, могут иметь большое количество клеточного дебриса. Анализ больших камер может занимать 10–20 мин, однако поиск сперматозоидов можно облегчить, используя флуоресцентное окрашивание (см. Раздел 2.11.2).

2.11.1 Оценка низкого числа сперматозоидов во всей усовершенствованной камере Нэйбауера (фазово-контрастная микроскопия)

Для снижения ошибок расчета должно быть подсчитано максимально возможное число сперматозоидов (предпочтительно общее число не меньше 400, при двух подсчетах по 200) (см. Бокс 2.7 и Табл. 2.2).

- Хорошо перемешайте образец эякулята (см. Бокс 2.3).
- Возьмите аликвоту спермы и разведите ее 1+1 (1:2) фиксатором (см. Раздел 2.7.5), соблюдая меры предосторожности, изложенные в Разделе 2.8.2.
- Разведение 1+1 (1:2) для образцов спермы, когда менее 2 сперматозоидов обнаружено в поле зрения при МВР на влажном препарате (табл. 2.3), пригодно для таких концентраций и дает около 200 сперматозоидов в гемоцитометре (см. Бокс 2.11). Необходимо будет оценить 9 квадратов.

Бокс 2.11 Достижение 200 сперматозоидов при расчете во всех девяти квадратах усовершенствованной камеры Нэйбауера

Если менее 2 сперматозоидов при МВР присутствуют в 4 нл на первичном влажном препарате, теоретически присутствует 0,5 сперматозоидов в нл (500 сперматозоидов в мкл, или 500 000 сперматозоидов в мл). Так как во всех 9 квадратах усовершенствованной камеры Нэйбауера содержится 900 нл, в них могло бы быть 450 сперматозоидов. Разведение 1+1 (1:2), как предполагают, снизит количество клеточного дебриса, число сперматозоидов доведет до 225 на камеру, что достаточно для достижения приемлемо низкой ошибки расчета.

Важно: Данное значение может быть оценено только приблизительно, так как слишком мало сперматозоидов подсчитано, и объем может быть измерен неточно.

2.11.1.1 Процедура

1. Разведите две аликвоты семени 1+1 (1:2) фиксатором, как описано выше.
2. Заполните каждую камеру гемоцитометра разведенной спермой.
3. Удерживайте гемоцитометр горизонтально не менее 4 мин при комнатной температуре во влажной камере (например, на влажной фильтровальной бумаге в закрытой чашке Петри) для предотвращения высыхания. Неподвижные клетки будут осаждаться в квадраты в течение этого времени.
4. Оцените гемоцитометр в фазово-контрастном микроскопе при увеличении $\times 200$ или $\times 400$.
5. Подсчитайте не менее 200 сперматозоидов на каждый повтор для достижения приемлемо низкой ошибки расчета (см. Бокс 2.7 и Табл. 2.2).
6. Оценивайте каждую камеру квадрат за квадратом и продолжайте расчет, пока не определите не менее 200 сперматозоидов и весь квадрат не будет оценен полностью. Расчет должен быть сделан на целом квадрате; не останавливайтесь в середине квадрата.
7. Запишите число оцененных квадратов при достижении не менее 200 сперматозоидов. То же самое число квадратов должно быть оценено в другой камере гемоцитометра.

8. Подсчитывайте число сперматозоидов и квадратов с помощью лабораторного счетчика.
9. Установите вторую камеру гемоцитометра и выполните второй подсчет того же числа квадратов (тот же объем), что и в первом расчете, даже если не получите 200 сперматозоидов.
10. Вычислите сумму и разницу двух значений.
11. Определите приемлемость различий из табл. 2.5 (которая есть расширение табл. 2.4 для низких концентраций) или рис. А7.1, Приложение 7. (Каждое показывает максимум различий между двумя подсчетами, которое можно ожидать в 95% образцах только из-за статистической ошибки).
12. Если различие приемлемо, вычислите концентрацию (см. Раздел 2.11.1.2). Если различие слишком велико, приготовьте два новых препарата, как описано выше, и повторите подсчет (см. Бокс 2.10).
13. Запишите среднее значение концентрации сперматозоидов, округлив его до двух значимых цифр.
14. Рассчитайте общее число сперматозоидов в эякуляте (см. Раздел 2.11.1.5).

2.11.1.2 Вычисление низкой концентрации сперматозоидов в эякуляте

Концентрация сперматозоидов в эякуляте — число сперматозоидов (N), разделенное на объем, в котором подсчитано данное число клеток, то есть объем общего числа оцененных квадратов (n) для повторных измерений (где объем квадрата равен 100 нл), умноженный на фактор разведения. То есть $C = (N/n) \times (1/100) \times \text{фактор разведения}$. Для разведения 1+1 (1:2) концентрация $C = (N/n) \times (1/100) \times 2$ сперматозоидов в нл = $(N/n) \times (1/50)$ сперматозоидов/нл.

Таблица 2.5 Приемлемые различия между двумя расчетами полученной суммы: низкая концентрация сперматозоидов

Сумма	Приемлемое различие*	Сумма	Приемлемое различие*	Сумма	Приемлемое различие*
35–40	12	144–156	24	329–346	36
41–47	13	157–169	25	347–366	37
48–54	14	170–182	26	367–385	38
55–62	15	183–196	27	386–406	39
63–70	16	197–211	28	407–426	40
71–79	17	212–226	29	427–448	41
80–89	18	227–242	30	449–470	42
90–98	19	243–258	31	471–492	43
99–109	20	259–274	32	493–515	44
110–120	21	275–292	33	516–538	45
121–131	22	293–309	34	539–562	46
132–143	23	310–328	35	563–587	47

*На основании округленного 95% доверительного интервала.

Когда оценены все девять квадратов в каждой камере гемоцитометра, общее число сперматозоидов делят на общий объем обеих камер (1,8 мкл) и умножают на фактор разведения (2) для получения концентрации сперматозоидов в мкл (тысяч на мл эякулята).

2.11.1.3 Чувствительность метода

Если оценено менее 200 сперматозоидов в каждой камере, ошибка расчета будет превышать 5%. Когда менее 400 сперматозоидов обнаружено в обеих камерах, запишите ошибку расчета для подсчитанного числа клеток (см. Табл. 2.2).

Если менее 25 сперматозоидов подсчитано в каждой камере, концентрация будет <56 000 сперматозоидов в мл; минимальное расчетное значение ошибки 20%, когда все девять квадратов усовершенствованной камеры Нэйбауера оценены и используют разведение 1+1 (1:2) (Cooper et al., 2006). Запишите наблюдаемое число сперматозоидов с комментарием «Слишком мало сперматозоидов подсчитано для точной оценки концентрации (<56 000/мл)».

Комментарий: Отсутствие сперматозоидов в оцениваемой аликвоте не всегда означает, что половые клетки отсутствуют в остальной части эякулята.

2.11.1.4 Примеры с решениями

Пример 1. При разведении 1+1 (1:2) первый подсчет дал 200 сперматозоидов в двух квадратах, второй — 250 сперматозоидов в двух квадратах. Сумма значений (200+250) равна 450 в четырех квадратах, различие (250–200) — 50. Из Табл. 2.5 видим, что различие превышает ожидаемое значение (42), поэтому результаты признаны непригодными и необходимо выполнить два новых повторных вычисления.

Пример 2. При разведении 1+1 (1:2) при первом подсчете обнаружено 210 сперматозоидов в трех квадратах, при втором — 200 сперматозоидов в трех квадратах. Сумма значений (210+200) равна 410 в шести квадратах, разница (210–200) равна 10. Из Табл. 2.5 видим, что разница меньше порогового значения (40), результат приемлем.

Концентрация сперматозоидов в образце при разведении 1+1 (1:2) равна $C = (N/n) \times (1/50)$ сперматозоидов в нл или $(410/6)/50 = 1.37$ сперматозоидов/нл, или $1,4 \times 10^6$ сперматозоидов в мл спермы (округление до двух значимых цифр).

Пример 3. При разведении 1+1 (1:2) при первом подсчете обнаружено 120 сперматозоидов во всех девяти квадратах, при втором — 140 сперматозоидов во всех девяти квадратах. Сумма значений (120+140) равна 260 в 18 квадратах, разница (140–120) равна 20. Из Табл. 2.5 видим, что разница меньше пороговой величины (32), результат признан годным. Когда оценены все девять квадратов в каждой камере (суммарно 1,8 мкл), концентрация сперматозоидов в таком образце при разведении 1+1 (1:2) равна $C = (N/1,8) \times 2$ сперматозоидов в мкл = $(260/1,8) \times 2 = 288,8$ сперматозоидов в мкл, или 290×10^3 сперматозоидов в мл спермы (округление до двух значимых цифр). Так как менее 400 сперматозоидов подсчитано, записываем ошибку расчета для 260 сперматозоидов из Табл. 2.2 (примерно 6%).

Пример 4. При разведении 1+1 (1:2) при первом подсчете обнаружено 10 сперматозоидов во всех девяти квадратах, при втором — 8 сперматозоидов во всех девяти квадратах. Так как менее 25 сперматозоидов подсчитано, концентрация будет <56 000/мл; записываем в отчет «18 сперматозоидов было найдено при двукратном подсчете, слишком мало для определения концентрации (<56 000/мл)».

Пример 5. При разведении 1+1 (1:2) ни одного сперматозоида не обнаружено ни в одной камере. Так как менее 25 сперматозоидов было подсчитано, концентрация <56 000/мл; запись в отчете «Ни одного сперматозоида не обнаружено, слишком мало для определения концентрации (<56 000/мл)».

2.11.1.5 Расчет общего числа сперматозоидов в эякуляте

Рекомендуется вычислять и записывать общее число сперматозоидов в эякуляте, так как этот параметр отражает способность яичек продуцировать сперматозоиды и потенцию мужского репродуктивного тракта. Значение получают умножением концентрации сперматозоидов на объем всего эякулята.

2.11.2 Оценка низкого числа сперматозоидов на одноразовых предметных стеклах большого объема (флуоресцентная микроскопия)

Использование камер большого объема, 100 мкм глубиной может повысить чувствительность оценки концентрации (Cooper et al., 2006). Предметное стекло большого объема имеет две камеры глубиной 100 мкм, каждая из которых 25 мкл. Для снижения ошибки расчета должно быть оценено достаточное количество сперматозоидов (предпочтительно оценивать суммарно не менее 400, по 200 на каждый расчет) (см. Бокс 2.7 и Табл. 2.2).

- Хорошо перемешайте образец эякулята (см. Бокс 2.3).
- Возьмите аликвоту спермы и разведите ее 1+1 (1:2) фиксатором (см. Раздел 2.7.5), содержащим Hoechst 33342 бизбензимида флюорохром (1 мг/л), следуя указаниям, описанным в Разделе 2.8.2.

Разведение 1+1 (1:2) для образцов спермы, для которых при первичной оценке было обнаружено менее 2 сперматозоидов (Табл. 2.3), является наиболее приемлемым, давая около 200 сперматозоидов в каждой камере (см. Бокс 2.12).

Бокс 2.12 Достижение подсчета 200 сперматозоидов на повтор в камере глубиной 100 мкм, одноразовой камере большого объема

Если только 1 сперматозоид присутствует в поле зрения при МВР в 4 нл на влажном препарате, теоретически содержится 0,25 сперматозоидов в нл (250 на мкл или 250 000 в мл). Камеры большого объема имеют размер 25 мкл, поэтому они могут содержать 6250 сперматозоидов. При разведении 1+1 (1:2), как предполагают, снижается количество клеточного дебриса и имеется 3125 сперматозоидов в камере, что достаточно для достижения приемлемо низкой ошибки расчета.

Важно: Это значение может быть оценено только приблизительно, так как подсчитано небольшое число сперматозоидов и объем измерен неточно.

2.11.2.1 Процедура

1. Разведите две аликвоты спермы 1+1 (1:2) фиксатором, как описано выше.
2. Заполните обе камеры предметного стекла аликвотами по 25 мкл.
3. Оставьте предметное стекло горизонтально на 10–15 мин в темноте при комнатной температуре во влажной камере (например, на влажной фильтровальной бумаге в закрытой чашке Петри) для предотвращения высыхания. Высыхание может вызвать склеивание головок сперматозоидов, неподвижные клетки осядут на дно камеры в это время.
4. Оцените предметное стекло во флуоресцентном микроскопе с использованием дихроичного зеркала и барьерного фильтра при увеличении $\times 250$.
5. Подсчитайте не меньше 200 сперматозоидов на каждом препарате для достижения приемлемо низкой ошибки расчета (см. Бокс 2.7 и Табл. 2.2).
6. Оцените одну камеру систематически поле за полем. Начните с одного угла и идите вдоль оси X к противоположной стороне; затем сместитесь на одно поле по оси Y и идите в противоположном направлении вдоль всей ширины. Продолжайте движение зигзагом (см. Рис. 2.9). Удерживайте предметное стекло в объективе, когда меняете поля зрения. Продолжайте расчет до достижения 200 сперматозоидов.
7. Запишите число полей зрения, на которых число сперматозоидов достигло 200. То же число полей зрения подсчитайте в другой камере.
8. Подсчитывайте число сперматозоидов и полей зрения с помощью лабораторного счетчика.
9. Установите вторую камеру и выполните второй расчет того же числа полей зрения (тот же объем), что и при первом подсчете, даже если во второй камере будет менее 200 сперматозоидов.
10. Вычислите сумму и различие двух подсчетов.
11. Определите приемлемость различий из Табл. 2.5 (которая распространяет Табл. 2.4 на случаи низкой концентрации) или Рис. A7.1, Приложение 7. (Показывают максимальное различие между двумя цифрами, которое можно ожидать в 95% образцах только из-за статистической ошибки).
12. Если различие приемлемо, рассчитайте концентрацию сперматозоидов (см. Раздел 2.11.2.2). Если различие слишком велико, приготовьте два новых препарата и повторите оценку (см. Бокс 2.10).
13. Запишите среднюю концентрацию сперматозоидов, округлив значение до двух значимых цифр.
14. Рассчитайте общее число сперматозоидов в эякуляте (см. Раздел 2.11.2.5).

Важно 1: Сперматозоиды выглядят как светлые флуоресцентные точки (конденсированные ядра) в отличие от лейкоцитов и не сперматогенных клеток, которые имеют диффузную флуоресценцию (свидетельство на то, что их ядра большего размера) (Zinaman et al., 1996).

Важно 2: Если источник флуоресцентного сигнала не определен, включите фазово-контрастную оптику, в которой можно различить жгутики сперматозоидов.

2.11.2.2 Вычисление низкой концентрации сперматозоидов в эякуляте

Концентрация сперматозоидов в эякуляте — число сперматозоидов (N), разделенное на объем общего числа оцененных полей зрения (n) (где объем (v) поля зрения рассчитывается как описано в Боксе 2.13), умноженное на фактор разведения. То есть $C = (N/n) \times (1/v) \times \text{фактор разведения}$.

При увеличении $\times 250$ объем поля зрения равен 80 нл (см. Бокс 2.13), при разведении 1+1 (1:2) концентрация составляет $C = (N/n) \times (1/80) \times 2$ сперматозоидов на нл = $(N/n) \times (1/40)$ сперматозоидов/нл (10^6 сперматозоидов на мл эякулята).

При увеличении $\times 400$ объем поля зрения равен 20 нл (см. Бокс 2.13), при разведении 1+1 (1:2) концентрация составляет $C = (N/n) \times (1/20) \times 2$ сперматозоида в нл = $(N/n) \times (1/10)$ сперматозоидов/нл (10^6 сперматозоидов в мл спермы).

Когда оценена вся область обеих камер, суммарное число сперматозоидов делят на общий объем обеих камер (50 мкл) и умножают на фактор разведения (2) для того, чтобы получить концентрацию сперматозоидов/мкл (тысяч в мл спермы).

Бокс 2.13 Расчет наблюдаемого объема поля зрения в камере глубиной 100 мкм

Объем спермы в каждом поле зрения микроскопа зависит от площади этого поля (πr^2 , где π приблизительно равно 3,142, а r — радиус поля зрения микроскопа) и глубины камеры (здесь 100 мкл).

Диаметр поля зрения микроскопа можно измерить с помощью микрометра предметного столика или оценить путем деления диаметра апертуры окуляра на увеличение объектива.

При объективе $\times 40$ и окуляре $\times 10$ с апертурой 20 мм поле зрения микроскопа имеет диаметр приблизительно 500 мкм (20 мм/40). В этом случае $r=250$ мкм, $r^2=62\,500$ мкм², $\pi r^2=196\,375$ мкм², а объем — 19 637 500 мкм³ или около 20 нл.

При объективе $\times 25$ и окуляре $\times 10$ с апертурой 25 мм поле зрения микроскопа имеет диаметр приблизительно 1000 мкм (25 мм/25). В этом случае $r = 500$ мкм, $r^2 = 250\,000$ мкм², $\pi r^2 = 785\,500$ мкм², а объем равен 78 550 000 мкм³, или около 80 нл.

2.11.2.3 Чувствительность метода

Если менее 200 сперматозоидов содержится в каждой камере, ошибка расчета будет превышать 5%. Когда менее 400 сперматозоидов найдено при двух подсчетах, запишите ошибку расчета для числа найденных сперматозоидов (см. Табл. 2.2).

Если менее 25 сперматозоидов выявлено в каждой камере, концентрация будет составлять <2000 клеток/мл (что является нижним предельным значением для статистической ошибки 20% при оценке всей камеры (25 мкл) и разведении 1+1 (1:2) (Cooper et al., 2006). Запишите найденное число сперматозоидов с комментарием «Слишком мало сперматозоидов обнаружено для точной оценки концентрации (<2000/мл)».

Комментарий: Отсутствие сперматозоидов в оцениваемой аликвоте не обязательно значит их отсутствие в остальном образце.

2.11.2.4 Примеры с решениями

Пример 1. При разведении 1+1 (1:2) при первом подсчете обнаружено 210 сперматозоидов в 300 полях зрения, при втором — 300 сперматозоидов в 300 полях зрения. Сумма значений (210+300) равна 510 на 600 полях зрения, разница (300–210) — 90. Из Табл. 2.5 видим, что различие превышает ожидаемое значение (44), таким образом результат признан неприемлемым, необходимо сделать два новых разведения.

Пример 2. При разведении 1+1 (1:2) при первом подсчете обнаружено 200 сперматозоидов в 400 полях зрения, при втором — 230 сперматозоидов в 400 полях зрения. Сумма значений (200+230) равна 430 в 800 полях зрения, разница (230–200) составляет 30. Из Табл. 2.5 видим, что различие меньше ожидаемого (41), поэтому значения признаны пригодными.

Концентрация сперматозоидов в образце при разведении 1+1 (1:2) равна $C = (N/n) \times (2/v)$ в нл. Если $v = 20$ нл (увеличение $\times 400$, см. Бокс 2.13), $C = (430/800) \times (2/20) = 0,0538$ сперматозоидов/нл, или 54 000 сперматозоидов в мл эякулята (округление до двух значимых цифр).

Пример 3. При разведении 1+1 (1:2) при первом подсчете обнаружено 50 сперматозоидов во всей камере, при втором — 70 клеток во всей камере. Сумма значений (50+70) равна 120 в двух камерах, разница (70–50) — 20. Из табл. 2.5. видим, что разница меньше ожидаемой (21), значения признаны приемлемыми.

Когда оценивают область обеих камер (суммарно 50 мкл), концентрация образца при разведении 1+1 (1:2) равна $C = (N/50) \times 2$ сперматозоидов в мкл = $(120/50) \times 2 = 4,8$ сперматозоидов/мкл, или 4800 сперматозоидов в мл (округление до двух значащих цифр). Так как менее 400 сперматозоидов подсчитано, в отчете ошибку расчета для 120 сперматозоидов следует брать из Табл. 2.2 (приблизительно 10%).

Пример 4. При разведении 1+1 (1:2) при первом подсчете обнаружено 20 сперматозоидов во всей камере, при втором подсчете — 18 сперматозоидов во всей камере. Так как менее 25 сперматозоидов найдено, концентрация будет <2000 сперматозоидов/мл. Запись результата «38 сперматозоидов найдено, что слишком мало для точного определения их концентрации (<2000/мл)».

Пример 5. При разведении 1+1 (1:2) ни одного сперматозоида не найдено ни в какой камере. Так как менее 25 сперматозоидов подсчитано, концентрация будет <2000 сперматозоидов/мл. Запись результата «Ни одного сперматозоида не обнаружено, слишком мало для точной оценки концентрации (<2000/мл)».

2.11.2.5 Вычисление общего числа сперматозоидов в эякуляте

Рекомендуется вычислять и записывать общее число сперматозоидов в эякуляте, так как этот параметр выражает способность яичек продуцировать сперматозоиды и поддерживать потенцию мужского репродуктивного тракта. Значение получают умножением концентрации сперматозоидов на объем всего эякулята.

2.12 Подсчет клеток, отличающихся от сперматозоидов

Присутствие не сперматогенных клеток в эякуляте может указывать на тестикулярное повреждение (незрелые половые клетки), патологию семявыносящей системы (цилиарные пучки) или воспаление желез дополнительной секреции (лейкоциты). Количество не сперматогенных клеток в эякуляте (эпителиальные клетки, округлые клетки — незрелые половые клетки и лейкоциты) или отдельные головки и жгутики сперматозоидов) можно оценить на фиксированных влажных препаратах с использованием гемоцитометра тем же способом, что и при оценке сперматозоидов (см. Раздел 2.8.3). Однако сперма, которую адекватно развели для подсчета сперматозоидов, будет слишком разведенной для точной оценки не сперматогенных клеток, за исключением случаев с их высокой концентрацией. Содержание округлых клеток вместе со сперматозоидами можно оценить на предметном стекле (см. Раздел 2.12.1). Альтернативно, их концентрацию можно определить во время оценки пероксидаза-положительных клеток (см. Раздел 2.18.1.5).

2.12.1 Вычисление концентрации округлых клеток в сперме

Концентрацию округлых клеток вычисляют вместе с концентрацией сперматозоидов с помощью оценки фиксированного и окрашенного мазка спермы, приготовленного из неразведенной спермы (см. Раздел 2.13.2). Если N есть число подсчитанных округлых клеток в одном и том же числе полей зрения, что и 400 сперматозоидов, а S — концентрация сперматозоидов (10^6 на мл), то концентрацию (C) округлых клеток (10^6 на мл) можно вычислить по формуле $C = S \times (N/400)$.

2.12.2 Чувствительность метода

Если число округлых клеток меньше, чем сперматозоидов в образце (то есть <400), ошибка расчета будет превышать 5%. В таком случае запишите ошибку для соответствующего числа подсчитанных клеток (см. Табл. 2.2). Если подсчитано менее 25 округлых клеток, запишите их число с комментарием «Слишком мало клеток для точного определения их концентрации».

2.12.3 Примеры с решениями

Пример 1. При первом подсчете обнаружено 21 округлая клетка на 200 сперматозоидов, при этом во втором подсчете — 39 округлых клеток на 200 сперматозоидов. Сумма значений (21+39) равна 60, различие (39–21) равно 18. Из Табл. 2.5 видно, что различие превышает мини-

мально допустимое (15), таким образом результат признается непригодным, необходимо произвести новую оценку.

Пример 2. При первом подсчете обнаружено 24 округлые клетки на 200 сперматозоидов, при втором — 36 на 200 сперматозоидов. Сумма значений (24+36) равна 60, разница (36–24) — 12. Из Табл. 2.5 видим, что разница меньше ожидаемой (15), таким образом значения признаны годными.

Для 60 округлых клеток на 400 сперматозоидов и при концентрации сперматозоидов 70×10^6 в мл, концентрация округлых клеток равна $C = S \times (N/400)$ клеток в мл = $70 \times 10^6 \times (60/400) = 10,5 \times 10^6$ клеток в мл или 10×10^6 клеток в мл (округление до значащих цифр). Так как менее 400 клеток было подсчитано, в отчете ошибку расчета для 60 клеток следует взять из Табл. 2.2 (приблизительно 13%).

Комментарий 1: Если концентрация округлых клеток превышает 1×10^6 на мл, состав клеток следует оценить с помощью теста на пероксидазную активность (см. Раздел 2.18) или маркеров лейкоцитов (см. Раздел 3.2) и их концентрацию затем указать более точно. Можно идентифицировать незрелые половые клетки на хорошо окрашенных препаратах (см. Раздел 2.19).

Комментарий 2: Общее число округлых клеток в эякуляте может отражать тяжесть воспаления или условия сперматогенеза. Значение получают умножением концентрации округлых клеток на объем всего эякулята.

2.13 Морфология сперматозоидов

Определение морфологии сперматозоидов состоит из следующих этапов (которые описаны более подробно в соответствующих разделах):

- Приготовление мазка спермы на предметном стекле (см. Раздел 2.13.2).
- Высушивание мазка на воздухе, фиксация и окраска (см. Раздел 2.14).
- Использование покровного стекла для защиты образца, если его хранят длительное время (см. Раздел 2.14.2.4 и 2.14.2.5).
- Оценка предметного стекла в световом поле при увеличении $\times 1000$ с иммерсионным маслом (см. Раздел 2.15 и 2.16)
- Анализ приблизительно 200 сперматозоидов на повтор для определения процента морфологически нормальных сперматозоидов или нормальных и аномальных форм (см. Раздел 2.15.2).
- Сравнение повторных значений для оценки приемлемости: если да, продолжение вычислений; если нет — оценка предметного стекла еще раз.

2.13.1 Понятие морфологически нормального сперматозоида

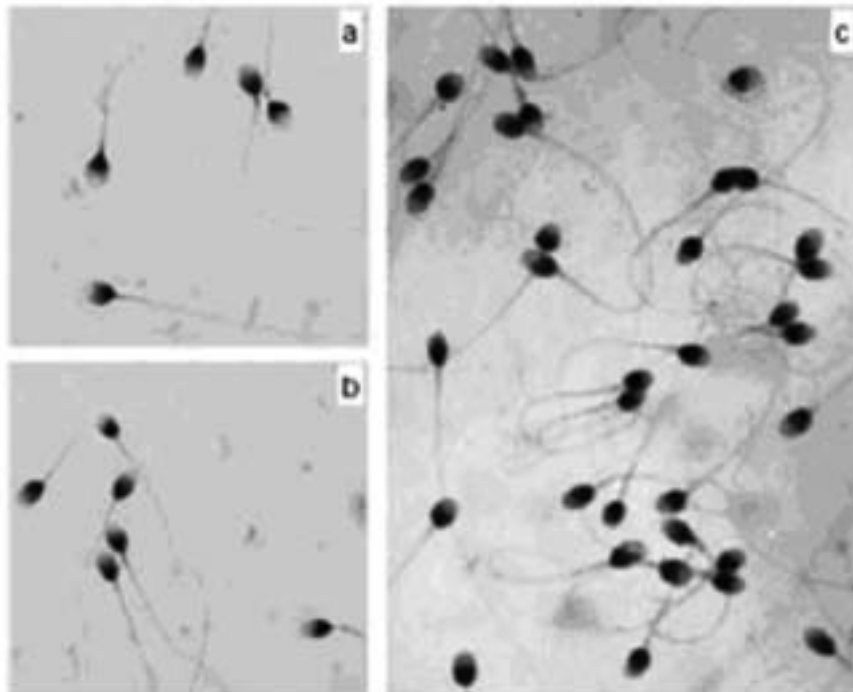
Вариабельность морфологических характеристик сперматозоидов человека затрудняет их оценку. Изучение сперматозоидов, полученных из женского репродуктивного тракта, особенно из цервикальной слизи

после полового контакта (Fredricsson & Björk, 1977; Menkveld et al., 1990), а также с поверхности зоны пеллюцида (Menkveld et al., 1991; Liu & Baker, 1992a) (см. Рис. 2.10) помогло определить внешний вид сперматозоида, обладающего оплодотворяющей способностью (морфологически нормального). Применение строгих критериев оценки морфологии сперматозоида позволяет установить соотношение (ассоциацию) между процентом морфологически нормальных форм и фертильностью (время до наступления беременности (time-to-pregnancy, ТТР), процент наступления беременности *in vivo* и *in vitro*) (Eggert-Kruse et al., 1996; Jouannet et al., 1988; Toner et al., 1995; Coetzee et al., 1998; Menkveld et al., 2001; Van Waart et al., 2001; Garrett et al., 2003; Liu et al., 2003), что может быть полезно для оценки фертильного статуса.

Философия классификационной системы, описанная здесь, основана на том, что морфологически нормальный сперматозоид принадлежит к субпопуляции мужских половых клеток, способных к оплодотворению и преобладающих в эндоцервикальной слизи. Используя эти критерии, диапазон процентного содержания морфологически нормальных значений как у фертильных, так и у мужчин с бесплодием, вероятно, равен 0–30%, лишь немногие образцы спермы содержат более 25% нормальных форм сперматозоидов (Menkveld et al., 2001). Такой невысокий показатель неизбежно приводит к его низкому пороговому значению; действительно, минимальное референсное значение и порог 3–5% нормальных форм получены в исследованиях оплодотворения *in vitro*

Рис. 2.10 Морфология «нормального» сперматозоида

(а, b) Окрашенные по Шорру сперматозоиды, полученные от зоны пеллюцида *in vitro*. (с) Окрашенные по Папаниколау сперматозоиды, полученные из цервикальной слизи после коитуса. Наблюдается крайне мало дефектов на головке сперматозоида, шейке и концевой части. Жгутики могут быть закручены, но не сильно под углом.



(а, b) Воспроизведено из Liu et al. (2003) с разрешения Европейского общества репродукции человека и эмбриологии. (с) Воспроизведено с любезного разрешения из Menkveld & Kruger (1990).

(Coetzee et al., 1998), внутриматочной инсеминации (Van Waart et al., 2001) и фертильности *in vivo* (Van der Merwe et al., 2005).

Зона пеллюцида человека также отбирает субпопуляцию подобных сперматозоидов, но и морфология этих сперматозоидов сильно варьирует (Liu et al., 1990; Garrett et al., 1997). Процент подвижных сперматозоидов в эякуляте мужчин, ставших недавно отцами, с морфологией клеток чаще отмеченных на зоне пеллюцида также низок (8–25%) (Liu et al., 2003).

2.13.2 Приготовление мазков эякулята

Быстрое добавление фиксатора в эякулят не позволяет адекватно оценивать сперматозоиды, так как они начинают скрываться за денатурированными белками семенной жидкости. Для морфологического анализа обычно готовят мазки эякулята, которые высушивают на воздухе до фиксации и окраски. Однако такой процесс приводит к морфологическим изменениям, так как суховоздушные мазки эякулята связаны с:

- нарушениями размеров сперматозоидов: высушенные, зафиксированные и окрашенные сперматозоиды становятся меньшего размера по сравнению с живыми сперматозоидами, визуализируемыми в эякуляте (Katz et al., 1986);
- увеличением головок незрелых сперматозоидов (Soler et al., 2000);
- потерей осмолярной чувствительности цитоплазматических капель (Abraham-Peskir et al., 2002; Cooper et al., 2004), хотя остается большое количество избыточной резидуальной цитоплазмы.

Следует делать два и более мазков из нативных образцов эякулята на случай проблем с окрашиванием или поломкой одного предметного стекла. Оценку выполняют дважды, предпочтительно на каждом стекле, так как они могут значительно различаться по морфологии сперматозоидов.

- Тщательно перемешайте образец эякулята (см. Бокс 2.3).
- Быстро возьмите аликвоту, не позволяя сперматозоидам осесть в суспензии.
- Перемешайте образец эякулята до взятия повторной аликвоты.
- Различные методики приготовления мазков эякулята могут быть использованы при различных условиях (Рис. 2.11).

2.13.2.1 Образцы нормальной вязкости

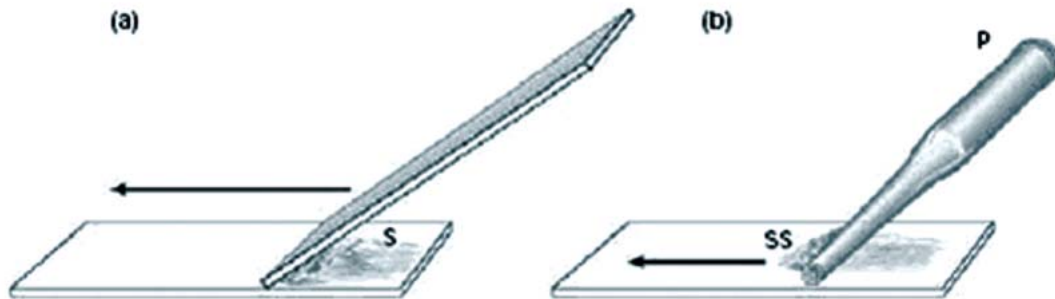
Для этого аликвоту спермы распределяют по всей поверхности предметного стекла методом «размазывания стеклом» (см. Рис. 2.11а, 2.12).

1. Энергично протрите обе поверхности предметного стекла безворсовой салфеткой
2. Маркируйте предметное стекло информацией об образце (то есть нанесите идентификационный номер, дату), используя карандаш средней мягкости (НВ или № 2).
3. Нанесите аликвоту 5–10 мкл в зависимости от концентрации сперматозоидов на конец предметного стекла. Используйте второе стекло

Рис. 2.11 Методы приготовления мазков эякулята для оценки морфологии сперматозоидов

(а) Метод получения мазка с помощью стекла, используемый для неразведенного эякулята. Каплю спермы (S) наносят на предметное стекло, второе предметное стекло помещают под углом к первому, так чтобы эякулят растекался вдоль нижней границы второго предметного стекла. Затем второе стекло продвигают по плоскости первого для получения мазка.

(б) метод с использованием пипетки для отмытых сперматозоидов. Каплю взвеси сперматозоидов (SS) размазывают по поверхности предметного стекла при помощи пипетки в горизонтальном положении (P).



для растягивания капли спермы вдоль поверхности (Рис. 2.11а, 2.12). Если предметные стекла не имеют матового шлифованного края, кромки можно использовать для создания мазка.

4. Высушите предметные стекла на воздухе и окрасьте их, как описано в Разделе 2.14.

Важно 1: Свинцовый карандаш устойчив при фиксации и окрашивании, а чернила и некоторые маркеры — нет.

Важно 2: Не позволяйте каплям спермы оставаться на конце предметного стекла более пары секунд перед приготовлением мазка.

Важно 3: Убедитесь, что капля эякулята на предметном стекле протянулась по всей ширине стекла; не используйте стекло для толчкообразных движений при создании мазка.

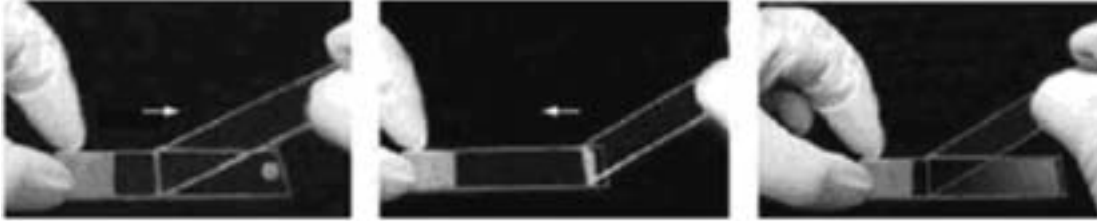
Качество мазка (минимальное перекрытие сперматозоидов на предметном стекле) зависит от:

- объема спермы и концентрации: чем меньшее число сперматозоидов, тем менее вероятно, что они перекроют друг друга;
- угла наклона шпателя для мазков (Hotchkiss 1945): чем меньше угол, тем тоньше мазок;
- скорости выполнения мазка (Eliasson 1971): чем больше скорость движения, тем толще мазок.

Начните с объема 10 мкл, угла 45° и скорости выполнения мазка около 1 сек. Эти параметры можно затем изменять, если это необходимо, для того, чтобы снизить перекрытие (наложение) сперматозоидов на предметном стекле (Menkveld et al., 1990). Такая методика хорошо рабо-

Рис. 2.12 Приготовление мазка эякулята с нормальной вязкостью

Для ощущения скольжения разместите стекло под углом 45° и двигайте им до контакта с аликвотой эякулята (левый рисунок), которая должна растечься вдоль кромки стекла (средний рисунок). Проведите стекло медленно назад (приблизительно за 1 сек) вдоль всей длины предметного стекла для создания мазка эякулята (правый рисунок).



Микрофотография любезно предоставлена С. Brazil.

тает, когда вязкость спермы низкая, однако она часто не подходит при повышенной вязкости эякулята (см. Рис. 2.12 и Раздел 2.13.2.3). Другие методы могут понадобиться при низких концентрациях спермы ($<2 \times 10^6/\text{мл}$), повышенной вязкости, спермы с большим количеством дебриса или для компьютерной оценки морфологии сперматозоидов (см. Раздел 3.5.4).

2.13.2.2 Образцы с низкой концентрацией сперматозоидов

Если концентрация сперматозоидов низкая (т. е. $<2 \times 10^6/\text{мл}$), сгустите образец эякулята:

1. Центрифугируйте образец спермы при 600 g в течение 10 мин.
2. Удалите большую часть супернатанта.
3. Аккуратно ресуспенсируйте осадок в оставшемся супернатанте с помощью пипетки.
4. Получите образец спермы с максимальной концентрацией, но не превышающей приблизительно $50 \times 10^6/\text{мл}$.
5. Исследуйте образец как сперму с нормальной концентрацией (см. Раздел 2.13.2.1).

Важно: Центрифугирование может влиять на морфологию сперматозоидов и ее использование должно быть документировано.

2.13.2.3 Образцы спермы с повышенной вязкостью

Иногда трудно приготовить хороший мазок из-за того, что семиологическая жидкость слишком вязкая, что приводит к неравномерной толщине мазка. Образцы с повышенной вязкостью могут быть обработаны аналогично эякуляту, который плохо разжижается (см. Раздел 2.3.1.1), или с помощью отмывания (см. Раздел 2.13.2.4).

Важно: Эти процедуры могут влиять на морфологию сперматозоидов, поэтому они должны быть запротоколированы.

2.13.2.4 Отмывание образцов спермы от клеточного дебриса или излишней вязкости и снижение основного фона при компьютерной оценке морфологии сперматозоидов

Клеточный дебрис и большое количество зернистого материала (например, повышенная вязкость) может приводить к тому, что сперматозоиды будут лежать своими головками на жгутиках, создавая трудности при анализе. Такие образцы могут быть отмыты следующим образом.

1. Разведите аликвоту спермы (0,2–0,5 мл в зависимости от концентрации) в 10 мл физиологического раствора (0,9 г NaCl на 100 мл дистиллированной воды) комнатной температуры.
2. Центрифугируйте при 800 g в течение 10 мин.
3. Слейте большую часть супернатанта.
4. Аккуратным пипетированием ресуспендируйте осадок в оставшемся супернатанте (обычно 20–40 мкл).
5. Приготовьте мазок суспензии, растянув каплю 5–10 мкл на предметном стекле с помощью пипетки Пастера (см. Рис. 2.11b).
6. Оцените предметное стекло в фазово-контрастном микроскопе при увеличении $\times 400$ для того, чтобы убедиться, что сперматозоиды распределены по всему мазку.
7. Проверьте, что присутствует не менее 40 сперматозоидов без слипания и их перекрывания в поле зрения при увеличении $\times 400$.
8. Высушите мазок на воздухе и покрасьте, как описано в Разделе 2.14.

Важно 1: Если на предметном стекле слишком много сперматозоидов перекрывают друг друга, приготовьте новый мазок с использованием меньшей аликвоты эякулята.

Важно 2: Если на предметном стекле слишком мало сперматозоидов, приготовьте другой мазок с использованием большей аликвоты эякулята.

Важно 3: Отмывание может влиять на морфологию сперматозоидов, поэтому процедура должна быть запротocolирована.

Комментарий: Хранение эякулята для разжижения больше чем на 30 мин до приготовления мазков может ослабить основной фон при окрашивании.

2.14 Методы окрашивания

Мазки эякулята, высушенные на воздухе, следует зафиксировать и окрасить для выявления особенностей сперматозоидов. Рекомендовано использование окрашивания по Папаниколау, Шорру или с помощью Diff-Quik.

При анализе в световом микроскопе все три способа окрашивания обеспечивают головке сперматозоида окрашиваться бледно-голубым в

акросомной области и темно-голубым в постакросомной области. Средняя часть окрашивается красным, а жгутик голубым или красноватым. Чрезмерная резидуальная цитоплазматическая капля, обычно локализованная вблизи головки и вокруг средней части, окрашивается розовым или красным (окраска по Папаниколау) или красновато-оранжевым (окраска по Шорру).

Комментарий: Коммерчески доступны методы быстрого окрашивания, при которых капля спермы смешивается с фиксатором и затем окрашивается уже на предметном стекле. Однако данные способы не рекомендуют из-за того, что невозможно проследить за распределением сперматозоидов на мазке и наблюдать особенности, необходимые для их морфологической классификации, приведенной здесь.

2.14.1 Традиционная фиксация и последующее окрашивание

Процедура включает следующие этапы:

- Этанол Фиксация клеток; а также их обезвоживание
- Разбавленный этанол Последовательное обезвоживание фиксированных мазков и возможности окрашивания водным раствором гематоксилина
- Дистиллированная вода Повторная гидратация высушенных мазков для возможности их окрашивания водным раствором гематоксилина
- Гематоксилин Окрашивание ядер в голубой цвет
- Водопроводная вода Удаление не связанного с ядрами гематоксилина
- Кислый этанол Удаление не специфически связанного красителя из цитоплазмы (обесцвечивание)
- Водопроводная вода Снижение кислотности и возвращение голубого окрашивания ядер
- Раствор Скотта Восстановление голубого окрашивания ядер (если водопроводная вода слишком жесткая)
- Этанол Обезвоживание мазков для возможности окрашивания спиртовым раствором Orange G/EA-50
- Orange G Окрашивание цитоплазмы в розовый цвет
- EA-50 Окрашивание цитоплазмы в розовый цвет
- Разбавленный этанол Последовательное обезвоживание окрашенных мазков для возможности использования нерастворимой в этаноле гистологической среды
- Ксилол Возможность использования нерастворимой в этаноле гистологической среды (см. Бокс 2.14)

Бокс 2.14 Среда для заключения препаратов

Предметные стекла могут быть покрыты или не покрыты средой для заключения (без или с прикреплением покровного стекла). Заключение препаратов позволяет хранить их длительное время, так что они могут быть оценены повторно, если это будет необходимо для внутреннего контроля качества. Индекс преломления среды для заключения после высыхания (1,50–1,55) сходен со стеклом (1,50–1,58) и наилучшее качество изображения можно получить, используя иммерсионное масло с аналогичным индексом преломления (1,52).

2.14.2 Процедура окрашивания по Папаниколау для оценки морфологии сперматозоидов

Окрашивание по Папаниколау дает хорошее контрастирование сперматозоидов и других типов клеток. Оно позволяет окрасить акросому и постакросомную область головки, цитоплазматические капли, шейку и жгутик. Модифицированный метод окраски, приведенный здесь, полезен при анализе морфологии сперматозоидов и при оценке незрелых половых клеток и не сперматогенных клеток (см. Вклейки 1–14). Рутинные процедуры модифицируют для работы без эфира (как фиксатора), либо без ксилола (как среды для заключения) (ESHRE/NAFA, 2002) (см. Раздел 2.14.2.4). Предметные стекла, окрашенные по Папаниколау, могут быть заключены для длительного хранения, для нужд внутреннего контроля качества. Если их хранить в темноте, препараты стабильны в течение нескольких месяцев и даже лет.

Следующий метод был использован для приготовления препаратов, описанных в данном Руководстве, где в качестве гистологической среды для заключения применяли нерастворимый в этаноле состав.

2.14.2.1 Реагенты.

1. Компоненты красителей по Папаниколау: коммерчески доступны или см. Приложение 4, Раздел А 4.10.
2. Кислый этанол: добавьте 1,0 мл концентрированной соляной кислоты к 200 мл 70% (v/v) этанола.
3. Ксилол : этанол, 1+1 (1:2): смешайте равные части 100% этанола и ксилола.

Важно 1: Ксилол потенциально опасен для здоровья и его следует использовать только в вытяжном шкафу.

Важно 2: Мазки следует высушивать на воздухе не менее 4 ч, их можно хранить до фиксации и окрашивания 1 неделю.

2.14.2.2 Фиксация мазков спермы, высушенных на воздухе

1. Погрузите предметные стекла в 95% (v/v) этанол не менее чем на 15 мин.

2.14.2.3 Окрашивание фиксированных мазков спермы

Последовательно погрузите предметные стекла в следующие растворы:

1. Этанол 80% (v/v)	30 с
2. Этанол 50% (v/v)	30 с
3. Дистиллированная вода	30 с
4. Гематоксилин Харриса	4 мин.
5. Дистиллированная вода	30 с
6. Подкисленный этанол	4–8 погружений*
7. Проточная холодная водопроводная вода	5 мин.
8. Этанол 50% (v/v)	30 сек
9. Этанол 80% (v/v)	30 сек
10. Этанол 95% (v/v)	Не менее 15 мин
11. Краситель G-6 оранжевый	1 мин
12. Этанол 95% (v/v)	30 сек
13. Этанол 95% (v/v)	30 сек
14. Этанол 95% (v/v)	30 сек
15. Краситель EA-50 зеленый	1 мин
16. Этанол 95% (v/v)	30 сек
17. Этанол 95% (v/v)	30 сек
18. Этанол 100%	15 сек
19. Этанол 100%	15 сек

*Одно погружение должно длиться около 1 сек.

Важно 1: Фиксация этанолом вызывает обезвоживание клеток. Именно поэтому для мазков, вынутых непосредственно из 95% этанола, для окрашивания необходима выдержка с течение 10 сек в 80% этаноле, при этом мазки, которые высушены на воздухе, после фиксации должны оставаться дольше (2–3 мин) в 50% этаноле.

Важно 2: В пункте 6, описанном выше, начните с 4 погружений и продолжайте до тех пор, пока результат не будет удовлетворительным. Это критический момент, так как направление обесцвечивания резко изменяет интенсивность конечной окраски. Если это пункт пропустить, сперматозоиды и основной фон будут темными. Увеличение числа погружений сделает сперматозоиды и основной фон светлее.

Важно 3: Предметные стекла могут быть заключены или не заключены в гистологическую среду.

2.14.2.4 Подготовка окрашенных мазков спермы до их заключения в гистологическую среду

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

- Используйте гистологические среды, растворимые в этаноле, сразу же на мазках с невысохшим этанолом.
- Для гистологических сред, нерастворимых в этаноле, возьмите предметные стекла сразу же после этапа 19, описанного выше, с последующими действиями (работайте в вытяжном шкафу):

1. Ксилол:этанол 1+1 (1:2) 1 мин
2. Ксилол 100% 1 мин

Удаляйте предметные стекла по одному за раз из ксилола и позвольте ему стечь в течение только 1–2 сек, так как стекло должно быть полностью влажным при заключении в гистологические среды.

2.14.2.5 Заключение окрашенных мазков спермы в гистологические среды

1. Добавьте две или три капли гистологической среды на предметное стекло.
2. Положите покровное стекло (24 × 50 мм или 24 × 60 мм, как наиболее пригодные) непосредственно на мазок.
3. Поместите покровное стекло таким образом, чтобы контакт с гистологической средой начинался по длинной стороне для предотвращения формирования пузырьков воздуха.
4. Если необходимо, аккуратно надавите на покровное стекло для того, чтобы помочь переместить пузырьки воздуха к краю стекла.
5. Уберите излишки ксилола (если они есть) из-под стекла.
6. Сушите заключенный мазок в горизонтальном положении в специальных контейнерах или на фильтровальной бумаге в течение 24 ч в вытяжном шкафу.

2.14.3 Окрашивание по Шорру для оценки морфологии сперматозоидов

Окрашивание по Шорру обеспечивает сходные значения морфологически нормальных форм сперматозоидов, как и окрашивание по Папаниколау (Meschede et al., 1993).

2.14.3.1 Реагенты

1. Гематоксилин Харриса: Папаниколау № 1.
2. Раствор Шорра: куплен в готовом виде либо приготовлен следующим образом. Растворите 4 г порошка Шорра в 220 мл подогретого 50% (v/v) этанола. Охладите, добавив 2 мл ледяной уксусной кислоты (в вытяжном шкафу) и профильтруйте.
3. Уксусный этанол: добавьте 25 мл ледяной уксусной кислоты в 75 мл от 95% (v/v) этанола.

4. Аммиачный спирт: добавьте 5 мл 25% (v/v) гидроксида аммония в 95 мл 75% (v/v) этанола.

2.14.3.2 Фиксация суховоздушных мазков спермы

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

2.14.3.3 Окраска фиксированных мазков спермы

Последовательно погрузите предметные стекла в следующие растворы:

- | | |
|---------------------------------|-------------------|
| 1. Проточная водопроводная вода | 12–15 погружений* |
| 2. Гематоксилин | 1–2 мин |
| 3. Проточная водопроводная вода | 12–15 погружений* |
| 4. Аммиачный спирт | 10 погружений* |
| 5. Проточная водопроводная вода | 12–15 погружений* |
| 6. Этанол 50% (v/v) | 5 мин |
| 7. Краситель Шорра | 3–5 мин |
| 8. Этанол 50% (v/v) | 5 мин |
| 9. Этанол 75% (v/v) | 5 мин |
| 10. Этанол 95% (v/v) | 5 мин |

*Одно погружение должно длиться около 1 сек.

Важно: Предметные стекла могут быть заключены или не заключены в соответствующие гистологические среды (бальзам, смолы).

2.14.3.4 Заключение окрашенных мазков спермы в гистологические среды

См. Разделы 2.14.2.4 и 2.14.2.5.

2.14.4 Процедура быстрого окрашивания для оценки морфологии сперматозоидов

Метод быстрого окрашивания особенно полезен в клинических лабораториях, когда необходимо получить результат в день сдачи анализа. Доступны некоторые другие наборы для окрашивания (Kruger et al., 1987). Некоторые мазки, окрашенные по методу быстрого окрашивания, могут иметь более низкое качество, по сравнению с мазками, окрашенными по Папаниколау.

2.14.4.1 Реагенты

1. Набор для быстрого окрашивания Diff-Quik, состоящий из:
 - a) фиксатора (триарилметан, растворенный в метиловом спирте);
 - b) красителя 1 (эозинофильный ксантен);
 - c) красителя 2 (базофильный тиазин).

2. Фиксатор: 1,8 мг триарилметана, растворенного в 1000 мл 95% (v/v) метанола, опционально.
3. Фиксатор: метанол 95% (v/v), опционально.

2.14.4.2 Фиксация суховоздушных мазков спермы

Погрузите предметные стекла в фиксатор триарилметан (согласно набору Diff-Quik или приготовленному, как описано выше) на 15 сек или в 95% метанол на 1 ч. Дайте лишнему фиксатору стечь, помещая предметные стекла вертикально на фильтровальной бумаге.

2.14.4.3 Окрашивание зафиксированных мазков спермы

Последовательно погрузите предметные стекла в следующие растворы:

1. Раствор для быстрого окрашивания 1 10 сек
2. Раствор для быстрого окрашивания 2 5 сек
3. Проточная водопроводная вода Погружение 10–15 раз для удаления лишнего красителя

Удаляйте излишний раствор на каждом этапе окрашивания путем помещения предметных стекол вертикально на фильтровальную бумагу.

Важно 1: Предметные стекла могут быть заключены в гистологические среды или не заключены.

Важно 2: Если произошло чрезмерное окрашивание фона, следует отмыть аликвоту спермы (см. Раздел 2.13.2.4), подготовить новые предметные стекла и их покрасить. Отмывка может повлиять на морфологию сперматозоидов, поэтому ее использование должно быть записано.

2.14.3.4 Заключение окрашенных мазков спермы в гистологические среды

См. Разделы 2.14.2.4 и 2.14.2.5.

2.15 Оценка окрашенных препаратов

При оценке окрашенных препаратов следует использовать иммерсионный объектив $\times 100$ и окуляр не менее $\times 10$. Более четкое изображение можно получить, когда жидкость со сходным индексом преломления (приблизительно 1,5) и стекло (1,50–1,58) поместить между линзами и препаратом, не заключенным в гистологическую среду, или покровным стеклом. Обычно для этих целей используют иммерсионное масло (индекс преломления 1,52). Гистологическая среда для заключения имеет сходный индекс преломления (1,50–1,55; см. Бокс 2.14).

2.15.1 Классификация морфологически нормальных сперматозоидов

Оценка морфологии сперматозоидов связана с некоторыми трудностями, такими как потеря объективности, вариации в интерпретации или плохим выполнением внешнего контроля качества (см. Раздел 7.13.2).

Метод, рекомендованный здесь, заключается в простой классификации «нормальный/аномальный» сперматозоид с необязательным указанием места аномальности у аномального сперматозоида.

Критерий, описанный здесь, следует использовать при оценке морфологии сперматозоида (Kruger et al., 1986; Menkveld et al., 1990; Coetzee et al., 1998). Минимальное референсное значение, данное здесь (Раздел 2.17.3), справедливо только, когда используют метод, описанный ниже.

Сперматозоид состоит из головки, шейки, средней части, основной части и концевой части жгутика. Так как концевую часть жгутика трудно увидеть в микроскоп, клетку можно рассматривать как состоящую из головки (и шейки) и жгутика (средняя и основная части). Для сперматозоида, который считают морфологически нормальным, как головка, так и жгутик должны быть нормальными. Все пограничные формы следует считать аномальными.

- Головка должна быть гладкой с четким контуром, овальной. Она должна иметь четко выраженную акросомную область, занимающую 40–70% области головки (Menkveld et al., 2001). Акросома не должна содержать больших вакуолей и не более двух маленьких вакуолей, которые не должны занимать больше 20% головки. Постакросомная область не должна содержать никаких вакуолей.
- Шейка должна быть тонкая, четко выражена и примерно той же длины, что и головка. Главная ось шейки должна совпадать с центральной осью головки сперматозоида. Цитоплазматическая капля рассматривается как аномальная только в случае, если она чрезмерно велика, то есть когда она превышает одну треть размера головки сперматозоида (Mortimer & Menkveld, 2001).
- Основная часть жгутика должна иметь одинаковый диаметр по всей длине, быть тоньше шейки и составлять приблизительно 45 мкм в длину (примерно в 10 раз больше длины головки). Жгутик может закручиваться сам на себя (см. Рис. 2.10с), при условии, что нет его поломки.

Комментарий 1: Согласно данному методу, форма головки сперматозоида — наиболее важный параметр, в отличие от ее размеров, если конечно они не чрезмерно аномальны.

Комментарий 2: Для различения головок сперматозоидов нормального и аномального размера может быть полезен микрометр на окуляре.

Комментарий 3: Размеры головок 77 сперматозоидов, окрашенных по Папаниколу (окрашены согласно процедуре, описанной в Разделе 2.14.2, и классифицированы как нормальные согласно критериям, описанным здесь), измеренные с помощью компьютерной системы (коэффициент вариации для повторных измерений 2–7%), имели следующие размеры: медиана длины 4,1 мкм, 95% доверительный интервал (CI) 3,7–4,7; медиана ширины 2,8 мкм, 95% CI 2,5–3,2; медиана соотношений длина-ширина 1,5, 95% CI 1,3–1,8.

Комментарий 4: Шейка 74 сперматозоидов, окрашенных по Папаниколау (окрашены согласно процедуре, описанной в Разделе 2.14.2, и классифицированы как нормальные согласно критериям, описанным здесь), измеренные с помощью той же компьютерной системы, имели следующие размеры: медиана длины 4,0 мкм, 95% CI 3,3–5,2; медиана ширины 0,6 мкм, 95% CI 0,5–0,7.

Комментарий 5: Закрученные жгутики (>360°; см. Рис. 2.13m) могут указывать на дисфункцию эпидидимиса (Pelfrey et al., 1982).

Такую оценку морфологически нормальных сперматозоидов лучше использовать при исследовании для выявления незначительных вариаций по форме всего сперматозоида (нормальные/пограничные головки и жгутики сперматозоидов; см. Раздел 2.16, Вклейки 1–12 и комментарии к ним).

2.15.2 Классификация морфологически аномальных сперматозоидов

Образцы спермы человека содержат сперматозоиды с различными типами нарушений. Дефектный сперматогенез и некоторые формы патологии эпидидимиса часто связаны с увеличенным количеством аномальных сперматозоидов. Морфологические дефекты часто сочетаны. Аномальный сперматозоид обычно имеет сниженный оплодотворяющий потенциал, зависящий от типа аномалии, и может содержать также аномальную ДНК. Морфологические дефекты связаны с усиленной фрагментацией ДНК (Gandini et al., 2000), повышенным риском структурных хромосомных aberrаций (Lee et al., 1996), незрелым хроматином (Dadoune et al., 1988) и анеуплоидией (Devillard et al., 2002; Martin et al., 2003). Именно поэтому акцент сделан на форму головки сперматозоида, хотя жгутик (средняя и основная его части) также рассматриваются. Необходимо отмечать следующие категории аномалии (дефекта) (см. Рис. 2.13):

- Дефекты головки: большая или маленькая, конусообразная, грушевидная, круглая, аморфная, вакуолизирующая (более двух вакуолей или >20% головки занимает неокрашенная вакуолярная область), вакуоли в постакросомной области, малого размера или крупная акросома (<40% или >70% области головки), двухголовый или любая комбинация вышеназванных дефектов.
- Дефекты шейки и средней части: ассиметричное прикрепление средней части к головке (гетероаксиальность), толстая или с неправильным контуром, чрезмерно изогнутая, аномально тонкая или любая комбинация названных характеристик.
- Дефекты основной части жгутика: короткая, множественная, сломанная, шпилькообразная, с резко выраженным углом, ширина с неправильным контуром, скрученная или любая комбинация названных характеристик.
- Чрезмерная резидуальная цитоплазма (*excess residual cytoplasm*, ERC) связана с аномальным сперматозоидом, формирующимся при аномальном сперматогенезе. Сперматозоид с большим количеством окра-

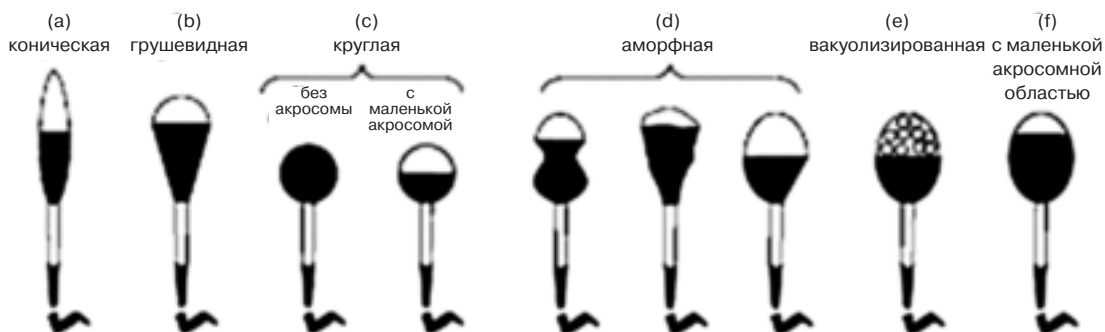
шенной цитоплазмы с неровным контуром, размером более одной трети головки, часто сочетаемым с дефектом средней части (Mortimer & Menkveld, 2001), считают аномальным. Такую аномалию не следует называть цитоплазматической каплей (Cooper, 2005).

Комментарий 1: Цитоплазматические капли (окруженные мембраной пузырьки на средней части в месте соединения головки со жгутиком) являются нормальным компонентом физиологически функционального сперматозоида. Если капли чрезмерно увеличены, они могут располагаться вдоль средней части жгутика, что наблюдают в фазово-контрастном микроскопе, в дифференциальном контрасте и при рентгеновой микроскопии живых клеток в сперме и цервикальной слизи (Abraham-Peskir et al., 2002; Fetic et al., 2006).

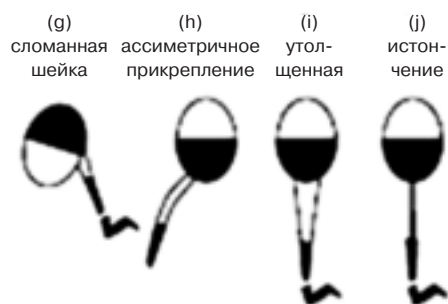
Комментарий 2: Цитоплазматические капли осмотически чувствительны и плохо сохраняются при рутинной процедуре сушки препаратов на воздухе (Chantler & Abraham-Peskir, 2004; Cooper et al., 2004). Их невозможно наблюдать на окрашенных препаратах, где они выглядят как небольшое расширение средней части. Цитоплазматические капли на фиксированных и окрашенных препаратах практически всегда меньше одной трети размера головки (Mortimer & Menkveld, 2001) и их не считают аномальными в таких случаях.

Рис. 2.13 Схематическое изображение некоторых патологических форм сперматозоидов человека

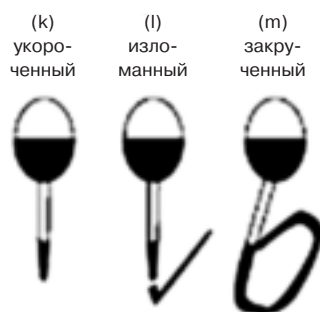
А. Дефекты головки:



В. Дефекты шейки и средней части:



С. Дефекты жгутика:



Д. Чрезмерная резидуальная цитоплазма:



Из Kruger et al., 1993, с любезного разрешения MQ Medical.

2.16 Морфология сперматозоидов на вклейках 1–14

Все микрофотографии на вклейках 1–14 были оценены согласно строгим морфологическим критериям, описанным выше. Анализ морфологии сперматозоидов субъективен и отчасти трудно поддается стандартизации, поэтому сделана эта попытка описать искусственные cut-off-точки между нормальными и аномальными клетками на основе множества характеристик головок и жгутиков сперматозоидов. Вклейки, которые идут ниже, были оценены единственным экспертом, доктором Т. Крюгером (Dr. Thinus Kruger). Оценки содержат дополнительные комментарии для того, чтобы гарантировать обоснованность всех типов аномалий.

Напротив каждой цветной вклейки есть таблица, описывающая морфологическую оценку каждого изображенного сперматозоида. В таблице указано, является ли головка нормальной или аномальной, указаны подробности аномалии головки, является ли средняя (шейка) или концевая части нормальными по форме, и можно ли рассматривать сперматозоид в общем морфологически нормальным. Другие важные замечания указаны в колонке «Комментарии». Сокращения объясняются в Табл. 2.6.

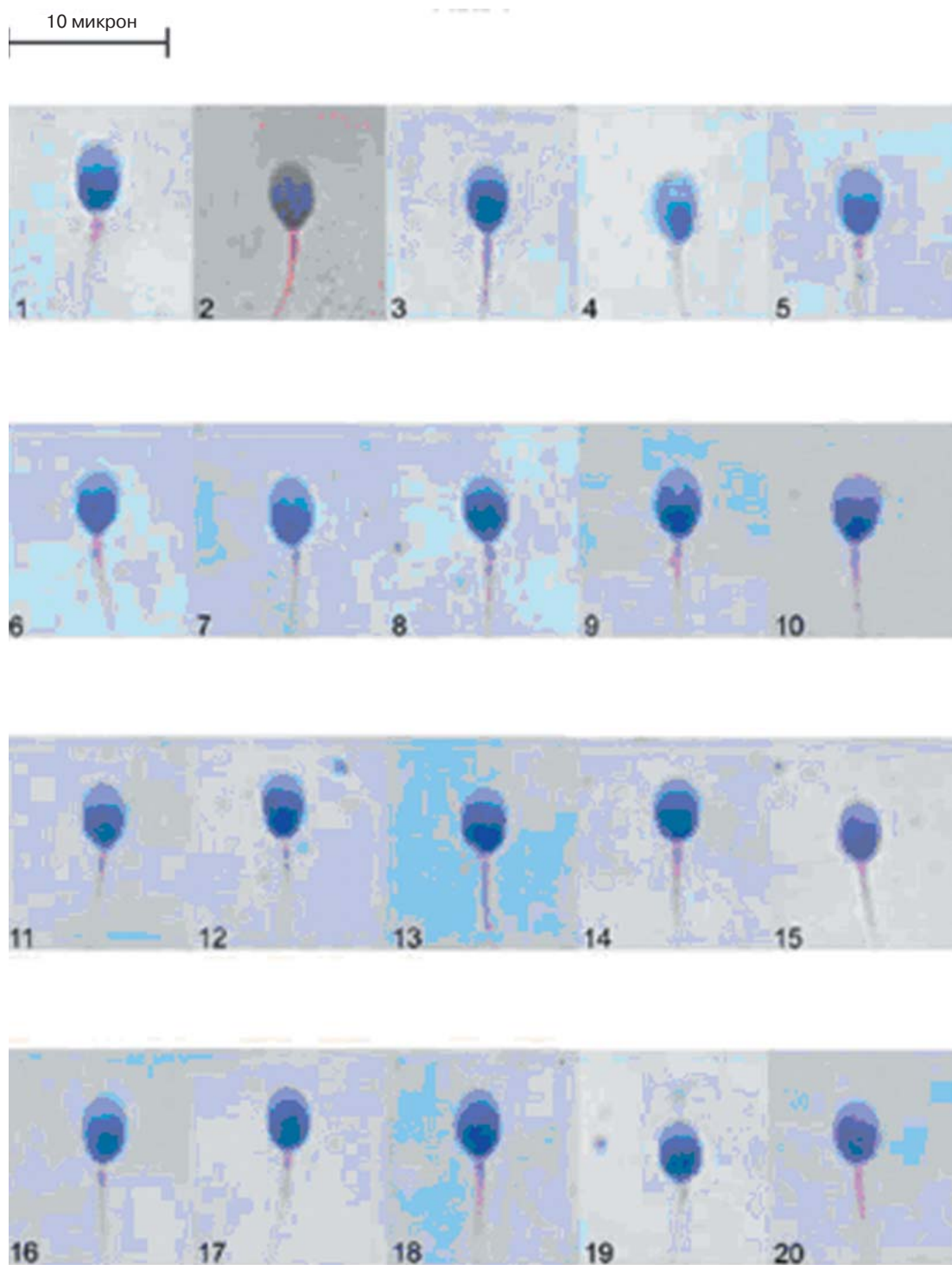
Таблица 2.6 Сокращения, используемые в комментариях к вклейкам 1–14

<40% акр	Менее 40% головки сперматозоида занято акросомой
>70% акр	Более 70% головки сперматозоида занято акросомой
>1/3	Аномальная цитоплазма (более одной трети размера головки)
<1/3	Нормальная цитоплазма (менее одной трети формы головки)
Аномальный	Не требует объяснения
Аморфный	Форма головки (см. Рис. 2.13d)
Бактерии	Бактерии
Изогнутость	Неестественный угол наклона (см. Рис. 2.13g и j)
Скрученный	Не требует объяснения
ЦК	Цитоплазматическая капля
Цитоплазма	Либо чрезмерная резидуальная цитоплазма, либо цитоплазматическая капля, в зависимости от размера
Дегенерирующий лейкоцит	Не требует объяснения
Дегенерирующая сперматида	Не требует объяснения
Дефект	Не требует объяснения
Двойной	Не требует объяснения
Клетка эпителия	Клетка эпителия из мужского полового тракта
ERC	Чрезмерная резидуальная цитоплазма (см. Рис. 2.13n)
Уплотнение	Основание головки сперматозоида не овальное

Продолжение табл. 2.6

Фокус	Клетка не в фокусе
Если основная часть жгутика нормальная	Не вся основная часть сперматозоида видна на микрофотографии (но если она нормальная, сперматозоид следует считать нормальным)
Асимметрия	Ассиметричное прикрепление жгутика к головке
Неправильный контур	Неправильный контур
Петлеобразный	Жгутик обмотан вокруг себя
Макрофаг	Фагоцитирующий лейкоцит
Моноцит	Агранулярный лейкоцит
Сперматίδα	Незрелая половая клетка
Нет акросомы	Акросома отсутствует
Нормальный	Сперматозоид, обнаруженный в цервикальной слизи
Недоступен	По причине перекрывания или не в фокусе
Наложение	Головка скрыта жгутиком
РА vac	Вакуоли в постакросомной области
Ацефалический (булавовидная головка)	Не сперматозоид; отсутствует хроматин
Полиморф	Полиморфноядерный лейкоцит
Грушевидный	Форма головки (см. Рис. 2.13b)
Круглый	Форма головки (см. Рис. 2.13c)
Нет фокуса	Сперматозоид находится не в фокусе
Микроголовка	Форма головки
Сперматίδα	Незрелая половая клетка
Сперматоцит	Незрелая половая клетка
Конический	Форма головки (см. Рис. 2.13a)
Толстый	Не требует объяснения
Слишком длинный	Не требует объяснения
Вак	Вакуоль
>2 вак	Более двух вакуолей

Вклейка 1

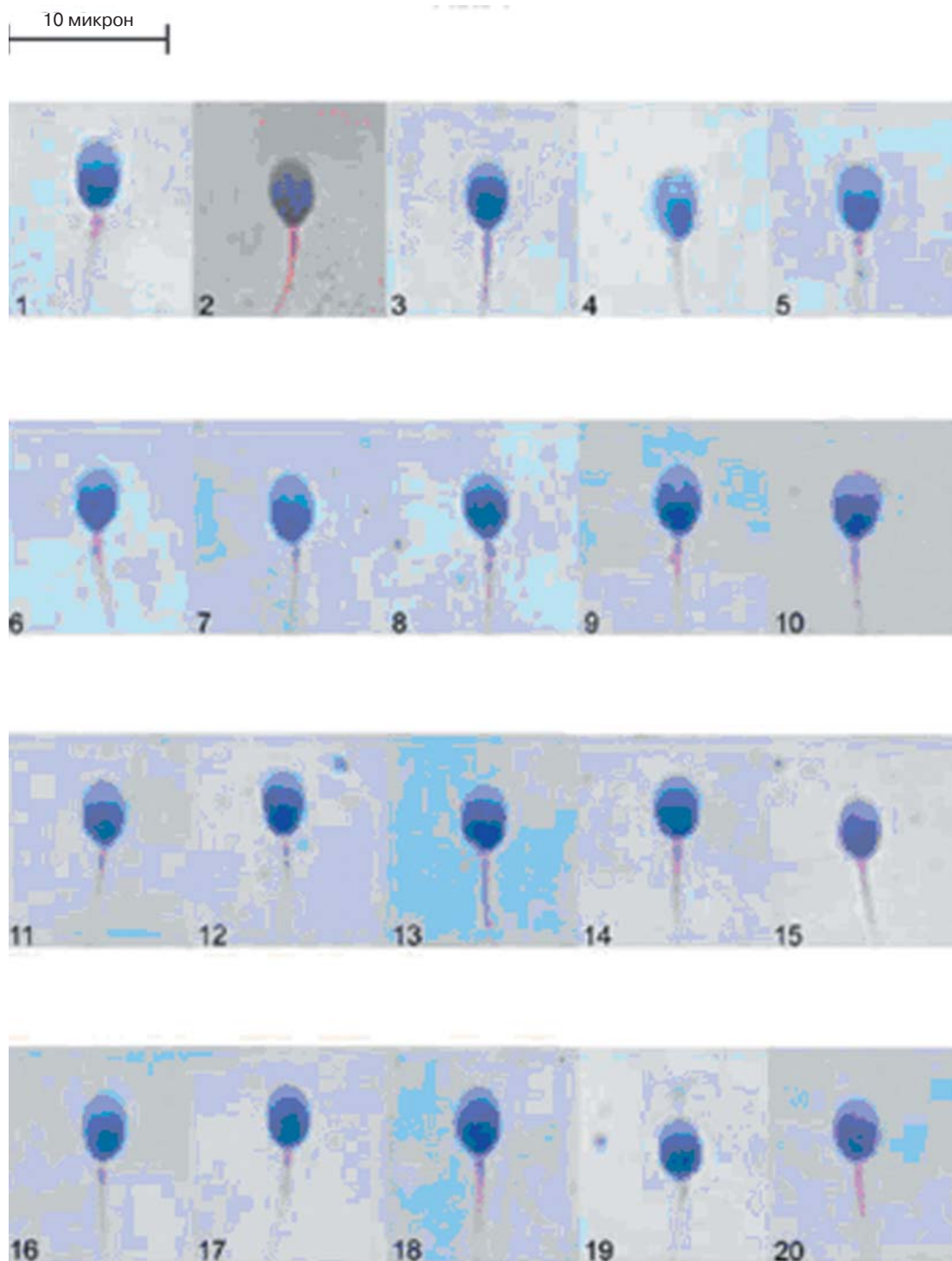


Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil

Морфологическая оценка сперматозоидов на вклейке 1.

Сперматозоид	Форма головки	Комментарии к головке	Комментарии		Суммарная классификация сперматозоида	Комментарии
			к средней части	к концевой части		
1	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
2	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
3	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
4	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
5	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
6	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
7	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
8	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
9	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
10	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
11	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
12	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
13	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
14	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
15	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
16	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
17	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
18	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
19	норма		норма		норма	если основная часть нормальная
20	норма		норма		норма	если основная часть нормальная

Вклейка 2

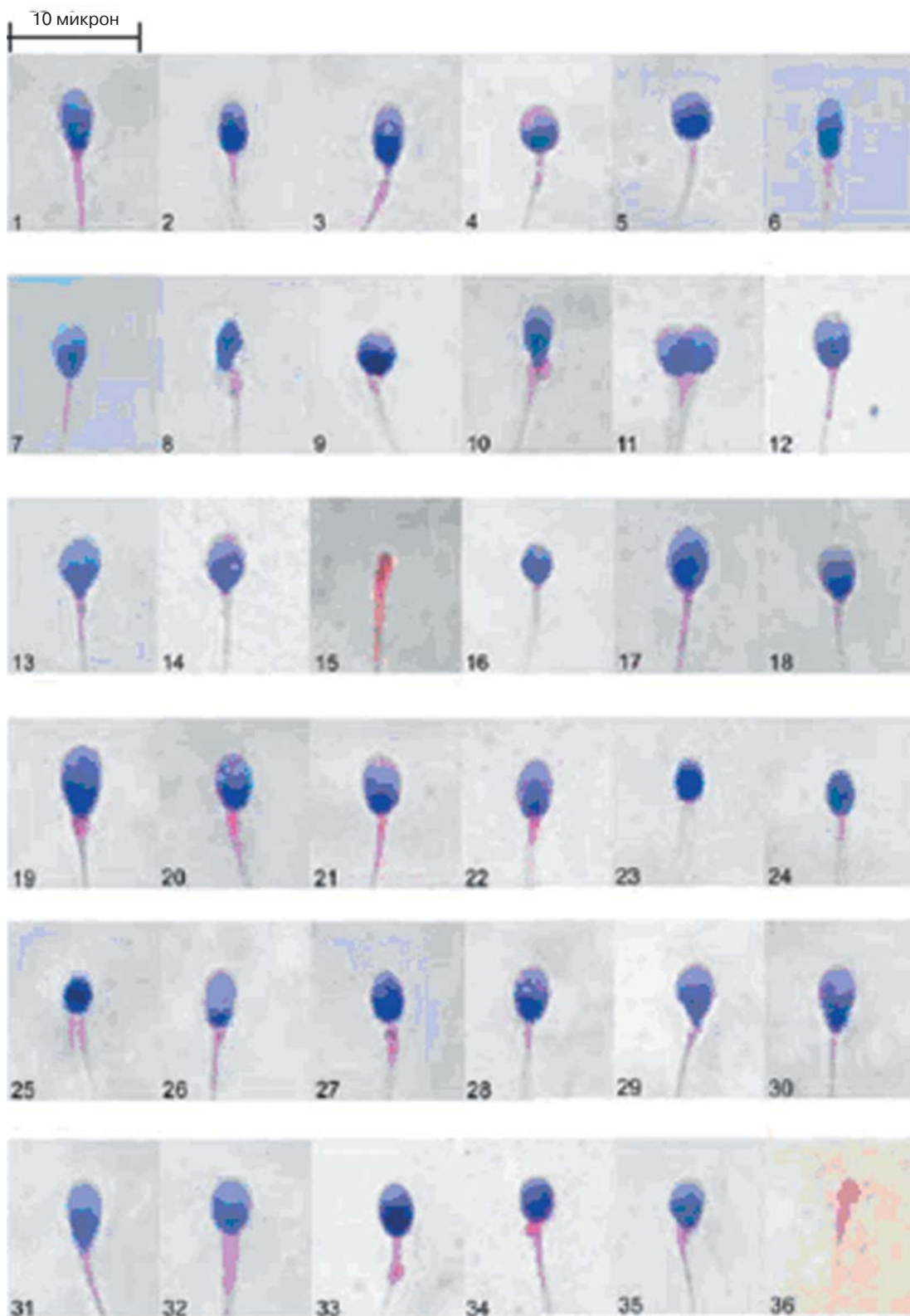


Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil

Морфологическая оценка сперматозоидов на вклейке 2.

Сперматозоид	Форма головки	Комментарии к головке	Комментарии к средней части	Комментарии к концевой части	Суммарная классификация сперматозоида	Комментарии
1	аномальная		утолщенная	двойная	аномальный	
2	аномальная				аномальный	
3	аномальная	грушевидная	изогнутость, неправильный контур, чрезмерная резидуальная цитоплазма		аномальный	>1/3
4	аномальная				аномальный	
5	аномальная	грушевидная			аномальный	
6	аномальная				аномальный	
7	аномальная				аномальный	
8	аномальная		утолщенная		аномальный	
9	аномальная		асимметрия		аномальный	
10	аномальная				аномальный	
11	аномальная				аномальный	
12	аномальная	грушевидная		изогнутость	аномальный	
13	аномальная	>2 вак, вакуоли в постакрсомной области			аномальный	
14	аномальная		утолщенная		аномальный	
15	аномальная	грушевидная	утолщенная, чрезмерная резидуальная цитоплазма		аномальный	>1/3
16	аномальная	грушевидная	чрезмерная резидуальная цитоплазма		аномальный	>1/3
17	норма	вакуоли в постакрсомной области			аномальный	
18	аномальная		утолщенная, асимметрия		аномальный	
19	аномальная		аномальный		аномальный	
20	аномальная		утолщенная		аномальный	
21	аномальная		утолщенная		аномальный	
22	аномальная				аномальный	
23	аномальная				аномальный	
24	норма	>2 вак	утолщенная		аномальный	
25	аномальная		утолщенная, изогнутость		аномальный	
26	аномальная		утолщенная		аномальный	
27	аномальная	>70% акр	утолщенная		аномальный	
28	аномальная		утолщенная		аномальный	
29	аномальная		утолщенная		аномальный	
30	аномальная		утолщенная		аномальный	
31	аномальная	грушевидная	утолщенная		аномальный	
32	аномальная	микроголовка	утолщенная		аномальный	
33	аномальная	микроголовка	утолщенная		аномальный	
34	аномальная		чрезмерная резидуальная цитоплазма		аномальный	>1/3
35	аномальная		утолщенная		аномальный	
36	аномальная		утолщенная		аномальный	

Вклейка 3

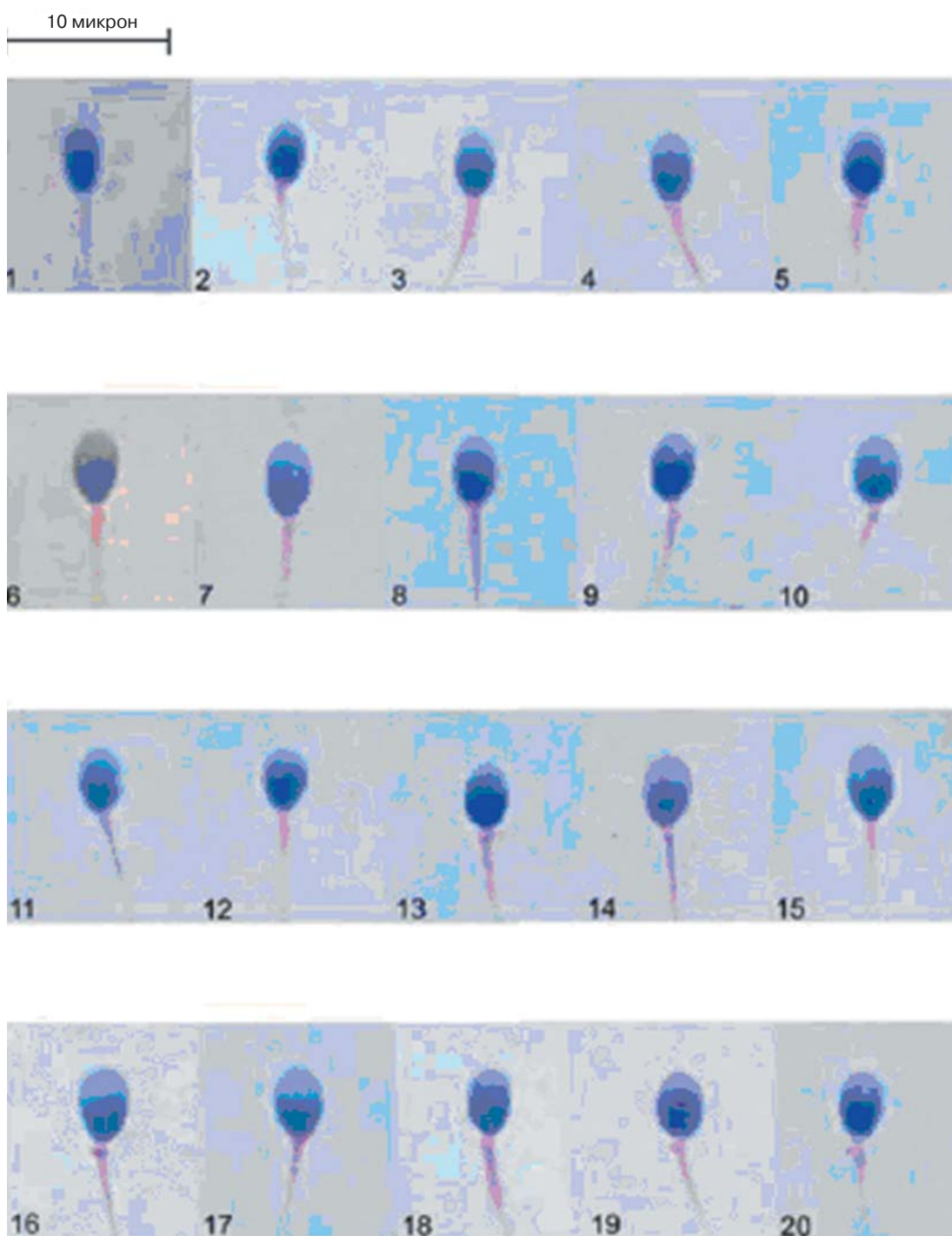


Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil

Морфологическая оценка сперматозоидов на вклейке 3

Сперматозоид	Форма головки	Комментарии к головке	Комментарии к средней части	Комментарии к основной части	Суммарная классификация сперматозоида	Комментарии
1	аномальная	коническая	утолщенная		аномальный	
2	аномальная				аномальный	
3	аномальная		неправильный контур		аномальный	
4	аномальная	круглая			аномальный	
5	аномальная	круглая			аномальный	
6	аномальная	коническая			аномальный	
7	аномальная	коническая			аномальный	
8	аномальная	аморфная	утолщенная		аномальный	
9	аномальная	круглая	утолщенная		аномальный	
10	аномальная	коническая	неправильный контур, утолщенная		аномальный	
11	—			—		две клетки
12	аномальная	>2 вак, вакуоли в постакросомной области			аномальный	
13	аномальная				аномальный	
14	нормальный	вакуоли в постакросомной области			аномальный	
15	—			—		ацефалический
16	аномальная	микроголовка			аномальный	
17	аномальная	макроголовка			аномальный	
18	нормальный		утолщенная		аномальный	
19	аномальная		утолщенная		аномальный	
20	аномальная	>2 вак	асимметрия		аномальный	
21	нормальный	>70% акр			аномальный	
22	аномальная	>70% акр			аномальный	
23	аномальная	<40% акр, микроголовка			аномальный	
24	аномальная	<40% акр. микроголовка			аномальный	
25	аномальная	<40% акр, микроголовка			аномальный	
26	аномальная	>70% акр			аномальный	
27	аномальная	<40% акр, >2 вак	неправильный контур		аномальный	
28	нормальный	>2 вак			аномальный	
29	аномальная	коническая			аномальный	
30	аномальная	коническая			аномальный	
31	аномальная	коническая			аномальный	
32	нормальный		утолщенная		аномальный	
33	нормальный		утолщенная		аномальный	
34	аномальная	<40% акр	утолщенная		аномальный	
35	аномальная		утолщенная, изогнутость		аномальный	
36	—			—		ацефалический

Вклейка 4



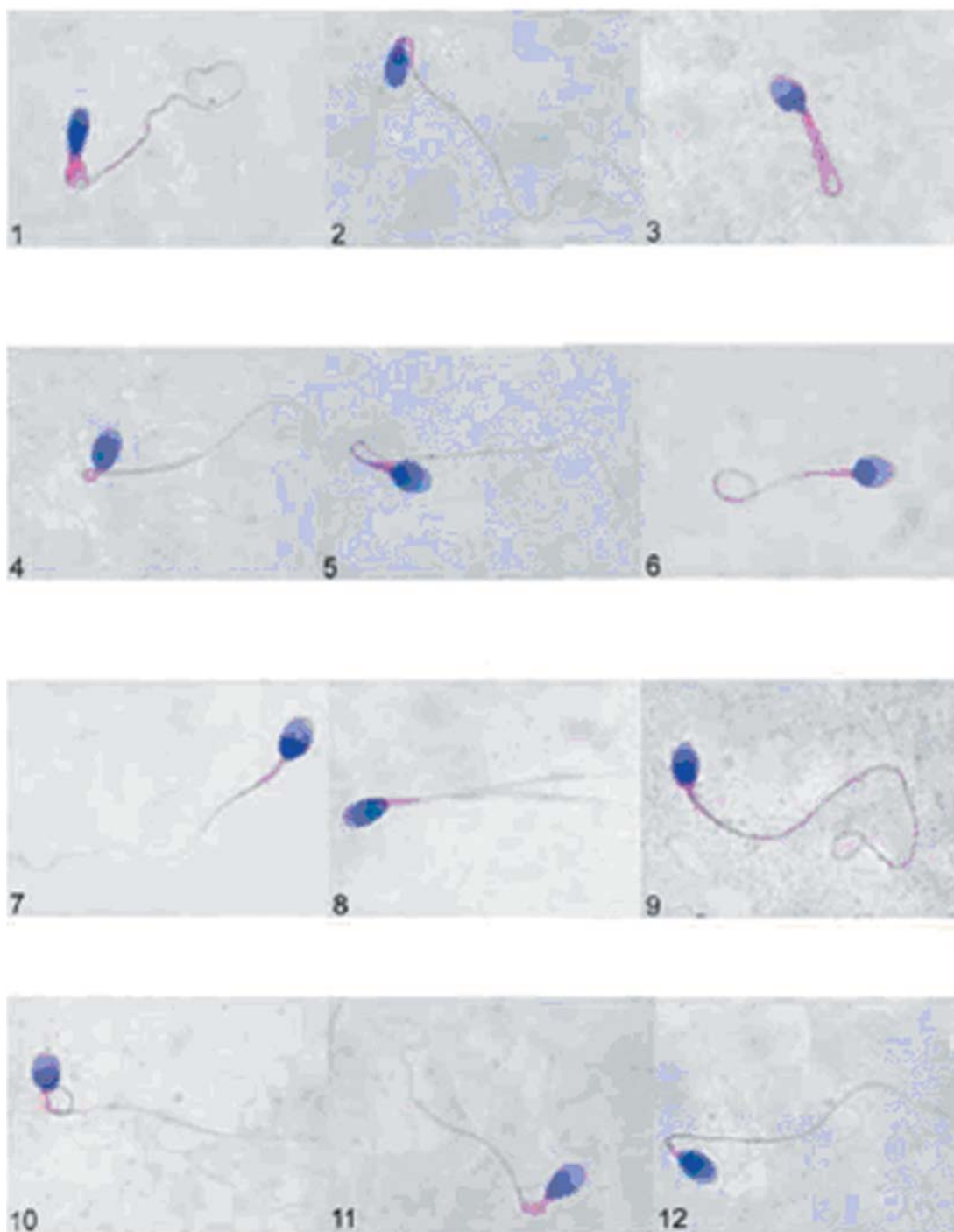
Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil

Морфологическая оценка сперматозоидов на вклейке 4.

Сперматозоид	Форма головки	Комментарии к головке	Комментарии к средней части	Комментарии к основной части	Суммарная классификация сперматозоида	Комментарии
1	аномальная	уплощение	утолщенная		аномальный	
2	нормальная		утолщенная, изогнутость		аномальный	
3	нормальная		утолщенная		аномальный	
4	нормальная		утолщенная, изогнутость		аномальный	
5	нормальная		утолщенная		аномальный	
6	нормальная		утолщенная		аномальный	
7	аномальная	неправильный контур			аномальный	
8	нормальная		утолщенная		аномальный	
9	нормальная		асимметрия, изогнутость		аномальный	
10	нормальная		утолщенная, изогнутость		аномальный	
11	аномальная	вакуоли в постакросомной области			аномальный	
12	аномальная				аномальный	
13	аномальная	<40% акр, >2 вак	утолщенная		аномальный	
14	нормальная		неправильный контур		аномальный	
15	нормальная		асимметрия		аномальный	
16	нормальная		утолщенная		аномальный	
17	нормальная		асимметрия, утолщенная		аномальный	
18	нормальная		утолщенная, слишком длинная		аномальный	
19	нормальная	<40% акр	асимметрия		аномальный	
20	нормальная	<40% акр	неправильный контур		аномальный	

Вклейка 5

10 микрон



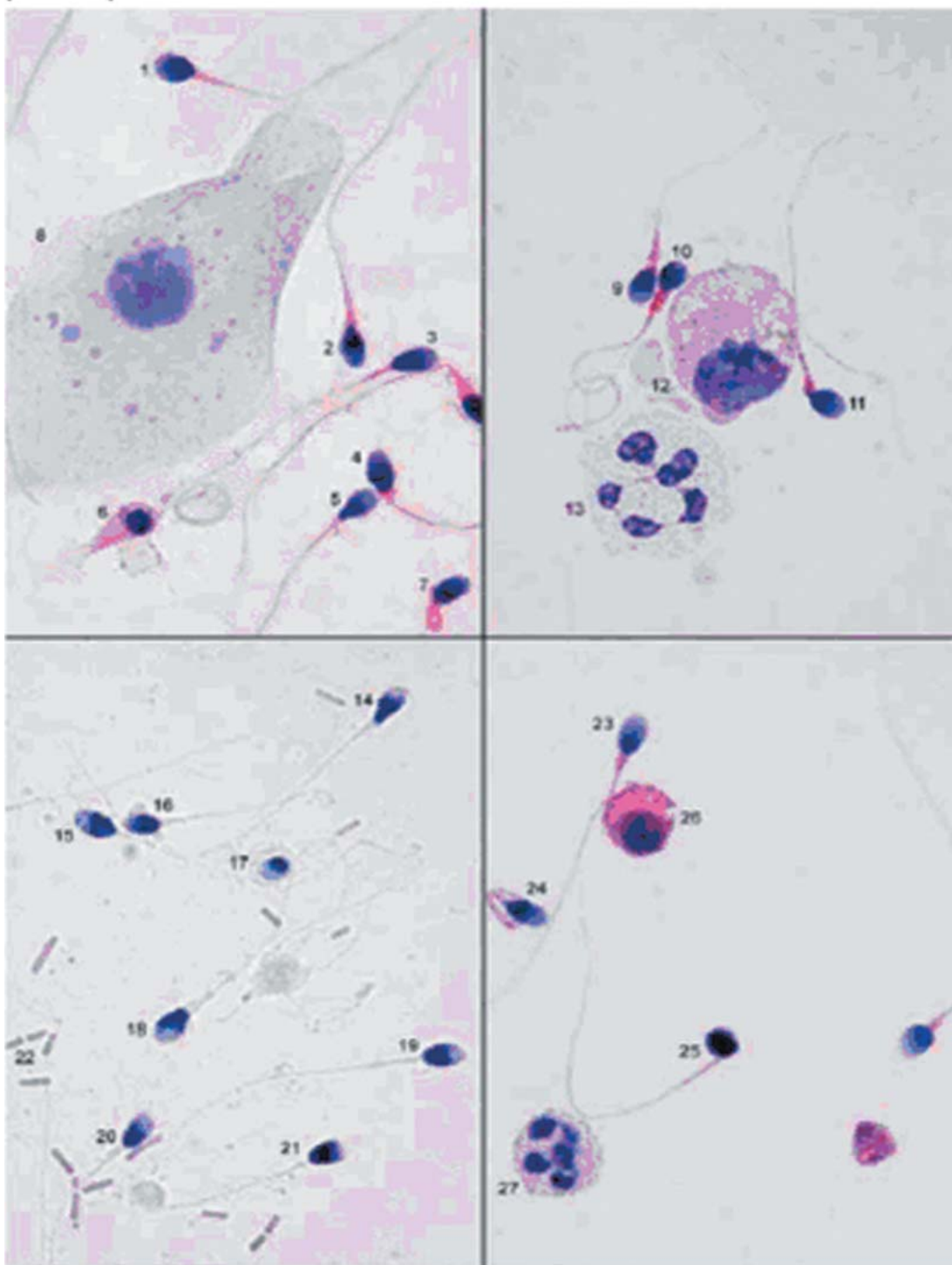
Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil

Морфологическая оценка сперматозоидов на вклейке 5.

Сперматозоид	Форма головки	Комментарии к головке	Комментарии к средней части	Комментарии к основной части	Суммарная классификация сперматозоида	Комментарии
1	аномальная		чрезмерная резидуальная капля		аномальный	>1/3
2	нормальная		изогнутость	нормальный	аномальный	
3	аномальная	>70% акр		петлеобразный	аномальный	
4	нормальная		изогнутость	нормальный	аномальный	
5	нормальная		утолщенная	петлеобразный	аномальный	
6	аномальная	вакуоли в постакросомной области		скрученный	аномальный	
7	нормальная				нормальный	
8	нормальная			двойной	аномальный	
9	аномальная			скрученный	аномальный	
10	аномальная		изогнутость, асимметрия	скрученный	аномальный	
11	нормальная		утолщенная	изогнутость	аномальный	
12	нормальная		изогнутость	нормальный	аномальный	

Вклейка 6

10 микрон



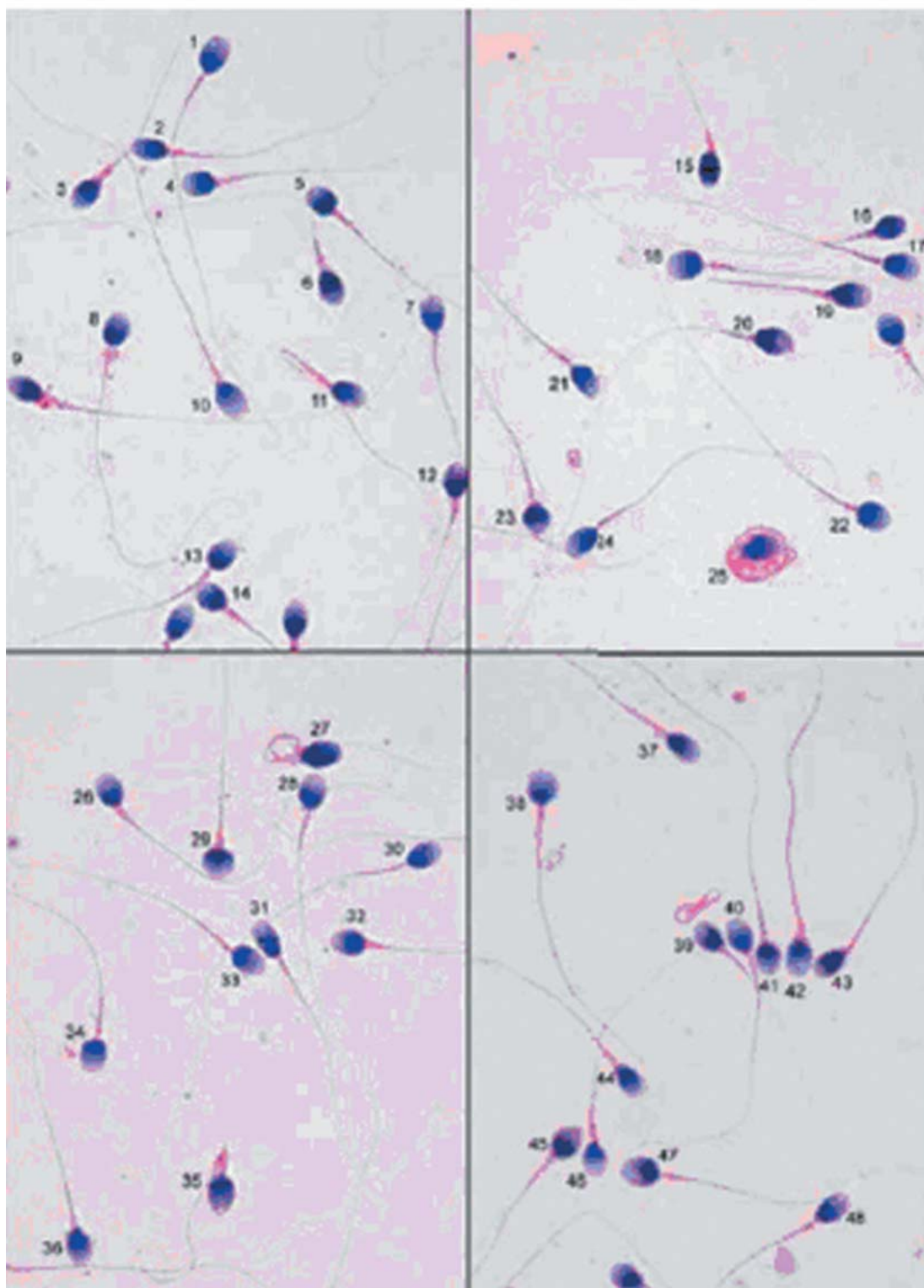
Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil

Морфологическая оценка сперматозоидов на вклейке 6.

Сперматозоид	Форма головки	Комментарии к головке	Комментарии к средней части	Комментарии к основной части	Суммарная классификация сперматозоида	Комментарии
1	нормальная	<40% акр	утолщенная	нормальная	аномальный	
2	нормальная		утолщенная		аномальный	
3	нормальная				нормальный	
4	аномальная		утолщенная		аномальный	
5	аномальная	коническая			аномальный	
6					невозможно классифицировать	аномальный сперматозоид
7	аномальная		утолщенная	скрученная	аномальный	
8						эпителиальная клетка
9	нормальная		утолщенная, асимметрия		аномальный	
10	аномальная	<40% акр	утолщенная		аномальный	
11	нормальная		утолщенная		аномальный	
12						дегенерирующий макрофаг?
13						полиморф
14	аномальная	грушевидная			аномальный	
15	нормальная				нормальный	
16	аномальная	<40% акр			аномальный	
17	аномальная	круглая		недоступна	аномальный	свободная головка?
18	аномальная		утолщенная		аномальный	
19	нормальная				нормальный	
20	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
21	аномальная	уплощение			аномальный	
22						бактерии
23	нормальная		утолщенная		аномальный	
24	нормальная		утолщенная	скрученная	аномальный	
25	аномальная	аморфная			аномальный	
26						сперматиды
27						полиморф

Вклейка 7

10 микрон



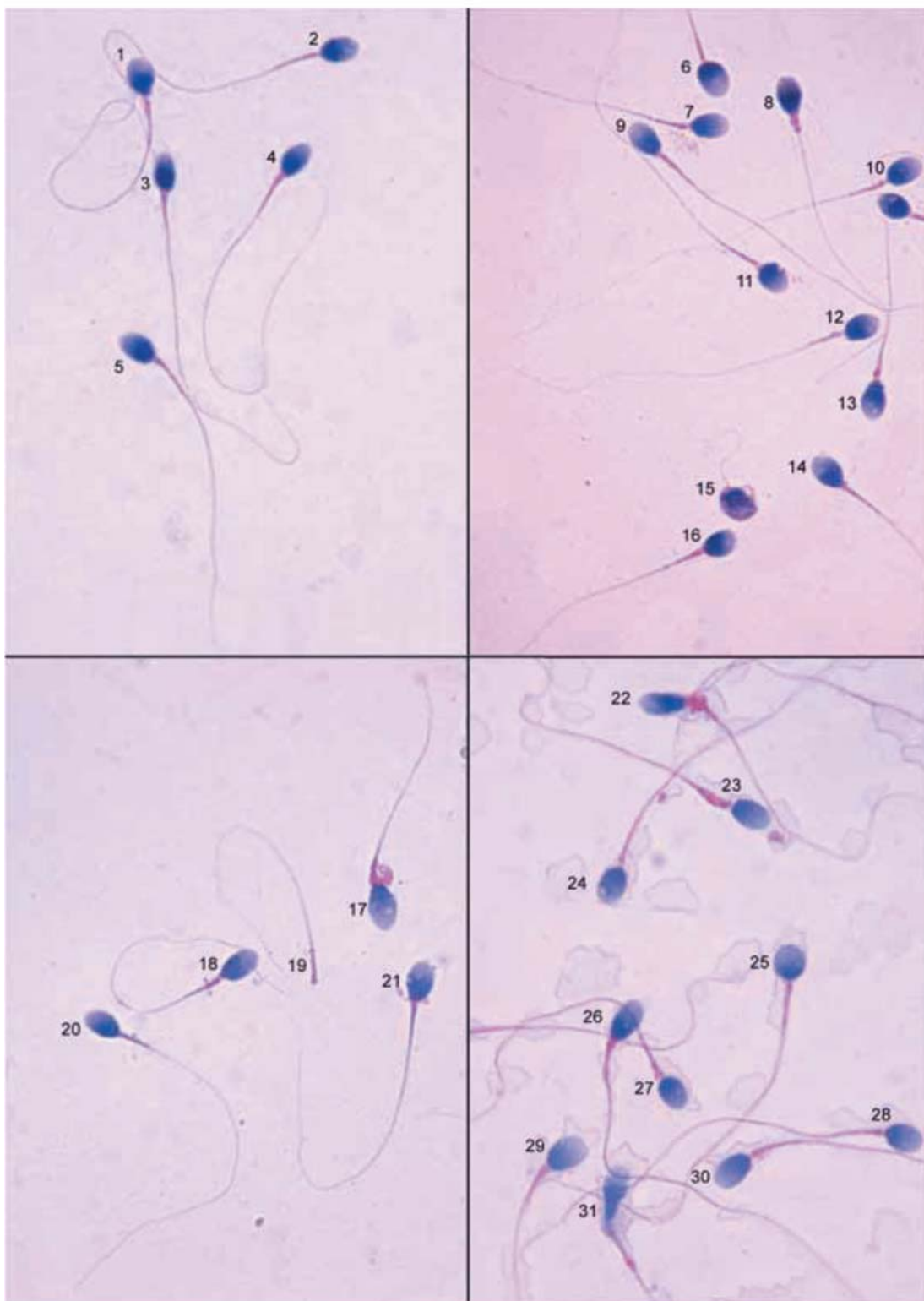
Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil

Морфологическая оценка сперматозоидов на вклейке 7.

Сперматозоид	Форма головки	Комментарии к головке	Комментарии к средней части	Комментарии к основной части	Суммарная классификация сперматозоида	Комментарии
1	нормальная	2 вак			нормальный	
2	нормальная				нормальный	
3	нормальная		утолщенная		аномальный	
4	нормальная				нормальный	
5	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
6	нормальная		утолщенная		аномальный	
7	нормальная	вакуоли на поверхности			нормальный	
8	нормальная		<1/3		нормальный	<1/3
9	аномальная		утолщенная, >1/3		аномальный	>1/3
10	нормальная				нормальный	
11	нормальная	вакуоли в постакросомной области		петлеобразная	аномальный	
12	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
13	нормальная	вакуоли в постакросомной области			аномальный	
14	нормальная	вакуоли в постакросомной области			аномальный	
15	аномальная	<40% акр	утолщенная		аномальный	
16	аномальная	<40% акр			аномальный	
17	нормальная				нормальный	
18	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
19	нормальная		утолщенная	укорочена	аномальный	
20	аномальная		утолщенная		аномальный	
21	нормальная	>2 вак			аномальный	
22	аномальная	круглая			аномальный	
23	аномальная	круглая			аномальный	
24	нормальная				нормальный	
25						головка сперматозоида в цитоплазме?
26	нормальная				нормальный	
27	нормальная	нет акросомы		скрученный	аномальный	
28	нормальная				нормальный	
29	аномальная	круглая			аномальный	
30	нормальная	вакуоли в постакросомной области			аномальный	
31	аномальная	коническая, вакуоли в постакросомной области			аномальный	
32	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
33	нормальная					нормальный
34	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
35	аномальная		утолщенная	изогнутость	аномальный	
36	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
37	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
38	аномальная	круглая			аномальный	
39	нормальная				нормальный	
40	нормальная				нормальный	
41	нормальная				нормальный	
42	нормальная		утолщенная		аномальный	
43	нормальная	<40 % акр			аномальный	
44		нет фокуса				нет оценки
45	аномальная	круглая			аномальный	
46	аномальная	круглая			аномальный	
47	нормальная				нормальный	
48	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная

Вклейка 8

10 микрон



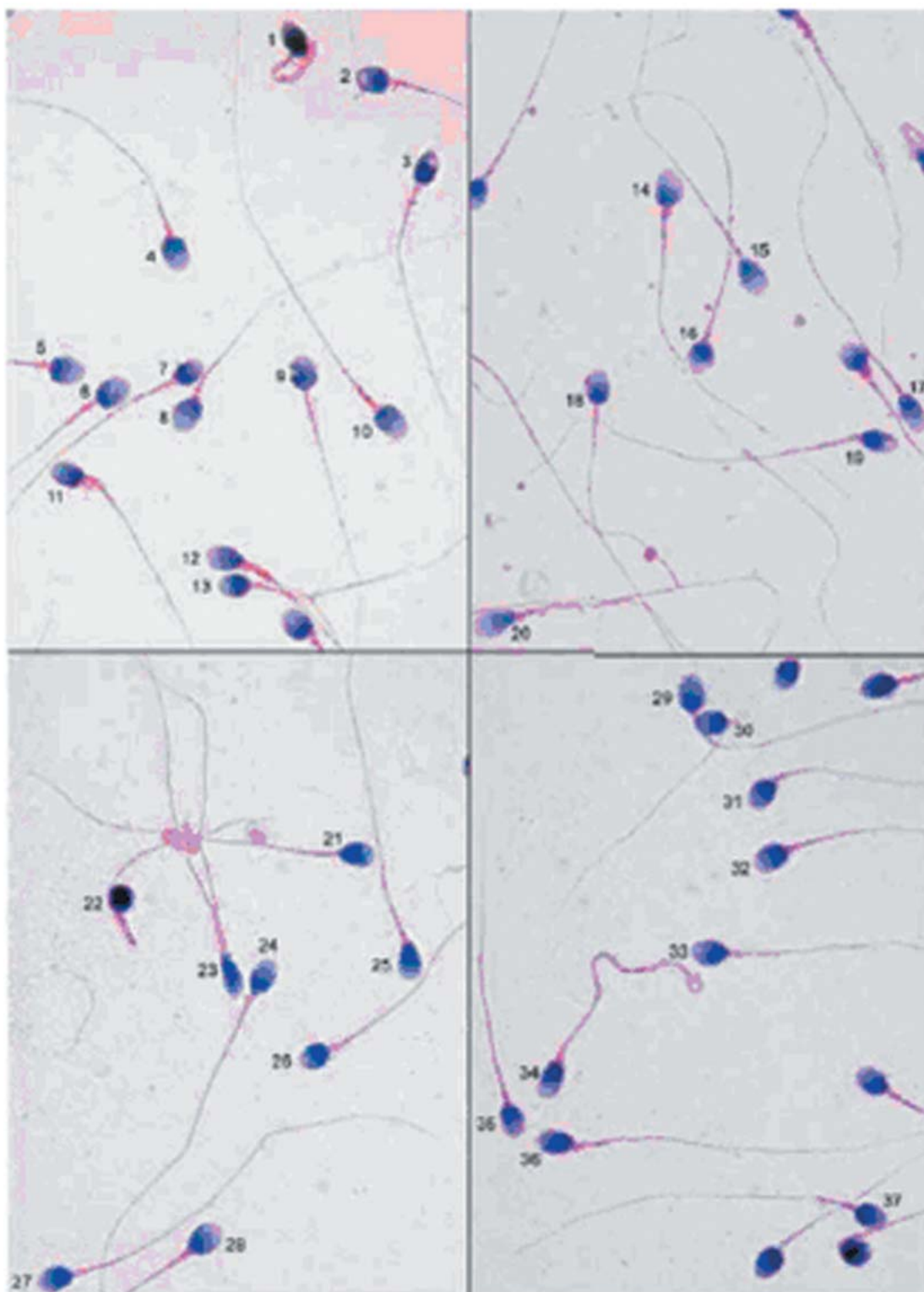
Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil

Морфологическая оценка сперматозоидов на вклейке 8.

Сперматозоид	Форма головки	Комментарии к головке	Комментарии к средней части	Комментарии к основной части	Суммарная классификация сперматозоида	Комментарии
1	нормальная			нормальная	нормальный	
2	нормальная	>2 вак		нормальная	аномальный	
3	аномальная	коническая			аномальный	
4	нормальная			нормальная	нормальный	
5	нормальная				нормальный	
6	нормальная				нормальный	если концевая часть нормальная
7	нормальная				нормальный	если концевая часть нормальная
8	нормальная		утолщенная		аномальный	
9	нормальная				нормальный	
10	нормальная				нормальный	
11	нормальная	вакуоли в постакросомной области			аномальный	
12	нормальная				нормальный	
13	аномальная				аномальный	
14	нормальная				нормальный	если концевая часть нормальная
15	аномальная	аморфная		дефект	аномальный	
16	нормальная				нормальный	если концевая часть нормальная
17	аномальная	>70% акр	утолщенная, >1/3		аномальный	>1/3
18	нормальная				нормальный	
19						ацефалический
20	нормальная				нормальный	
21	нормальная	вакуоли в постакросомной области			аномальный	
22	аномальная	коническая	утолщенная, >1/3		аномальный	>1/3
23	аномальная	уплощение	утолщенная		аномальный	
24	нормальная	>2 вак			аномальный	
25	аномальная	круглая			аномальный	
26	нормальная		утолщенная		аномальный	
27	нормальная		утолщенная		аномальный	
28	нормальная	>2 вак, >70% акр			аномальный	
29	аномальная				аномальный	
30	нормальная	>70% акр			аномальный	
31	аномальная	грушевидная			аномальный	

Вклейка 9

10 микрон



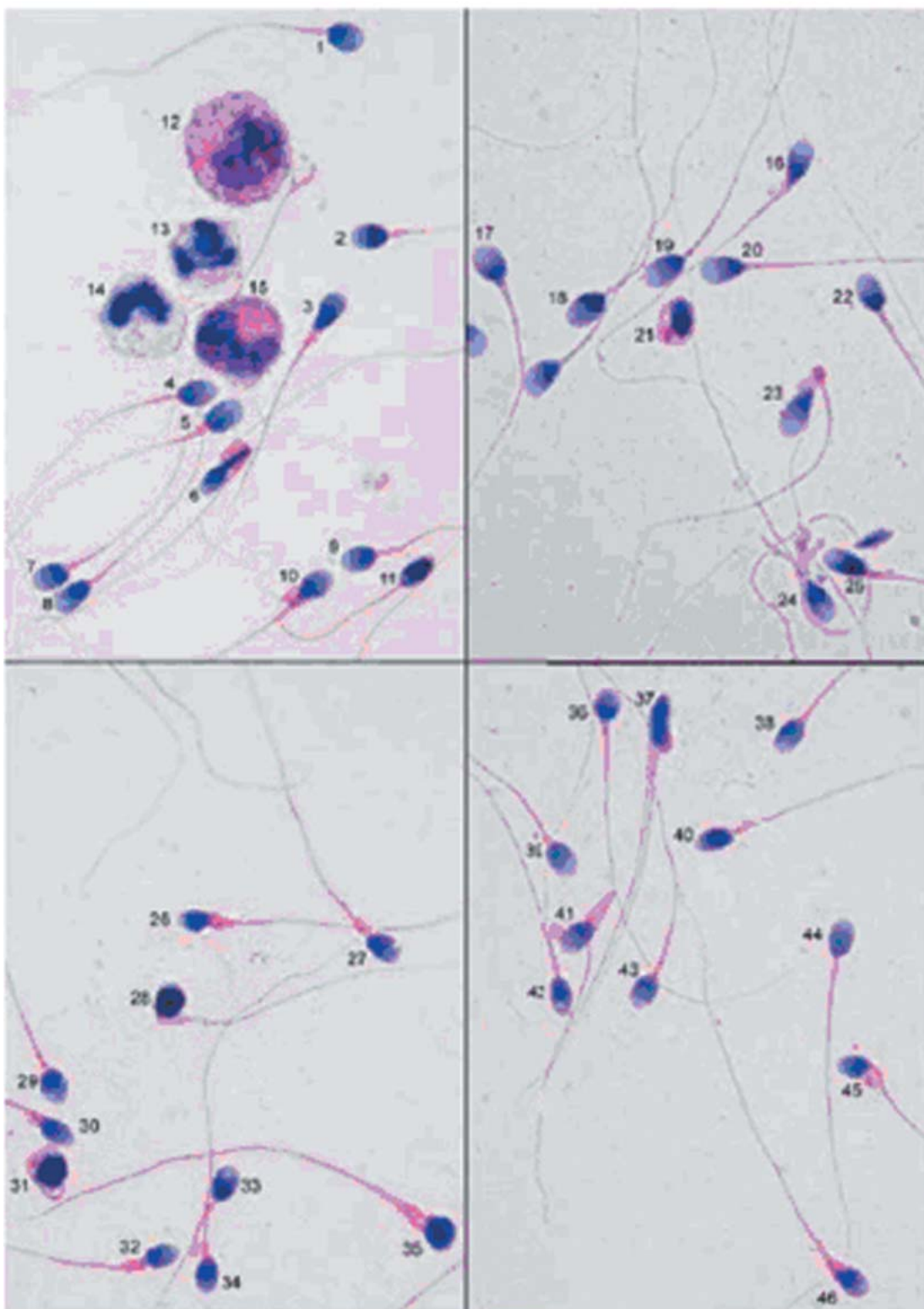
Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil.

Морфологическая оценка сперматозоидов на вклейке 9.

Сперматозоид	Форма головки	Комментарии к головке	Комментарии к средней части	Комментарии к основной части	Суммарная классификация сперматозоида	Комментарии
1	аномальный			скрученный	аномальный	
2		наложение				недоступен
3	аномальный	<40% акр			аномальный	
4	нормальный				нормальный	если основная часть нормальная
5	нормальный				нормальный	если основная часть нормальная
6	нормальный	>70% акр	наложение		аномальный	
7	нормальный		наложение		аномальный	
8	нормальный	>70% акр	наложение		аномальный	
9	аномальный	РА vac			аномальный	
10	нормальный	>2 вак	утолщенная		аномальный	
11	аномальный		утолщенная, ERC		аномальный	>1/3
12	аномальный		утолщенная, наложение, ERC		аномальный	>1/3
13	нормальный				нормальный	если основная часть нормальная
14	аномальный		утолщенная		аномальный	
15	нормальный			нормальный	нормальный	
16	аномальный				аномальный	
17	аномальный	конический, 3 вак, РА vac			аномальный	
18	нормальный				нормальный	
19	аномальный	вак >20%			аномальный	
20	аномальный	конический			аномальный	
21	нормальный	РА vac			аномальный	
22	аномальный	аморфный		изогнутость	аномальный	
23	аномальный	конический		двойной	аномальный	
24	аномальный	РА vac			аномальный	
25	нормальный	>2 вак			аномальный	
26	нормальный				нормальный	если основная часть нормальная
27	нормальный				нормальный	
28	нормальный				нормальный	если основная часть нормальная
29		наложение				недоступен
30		наложение				недоступен
31	нормальный				нормальный	если основная часть нормальная
32	нормальный				нормальный	если основная часть нормальная
33	нормальный				нормальный	если основная часть нормальная
34	нормальный		утолщенная	толстая, скрученный	аномальный	
35	аномальный	1 сторона не овальная			аномальный	
36	нормальный	<40% акр			аномальный	
37		наложение				недоступен

Вклейка 10

10 микрон
|-----|



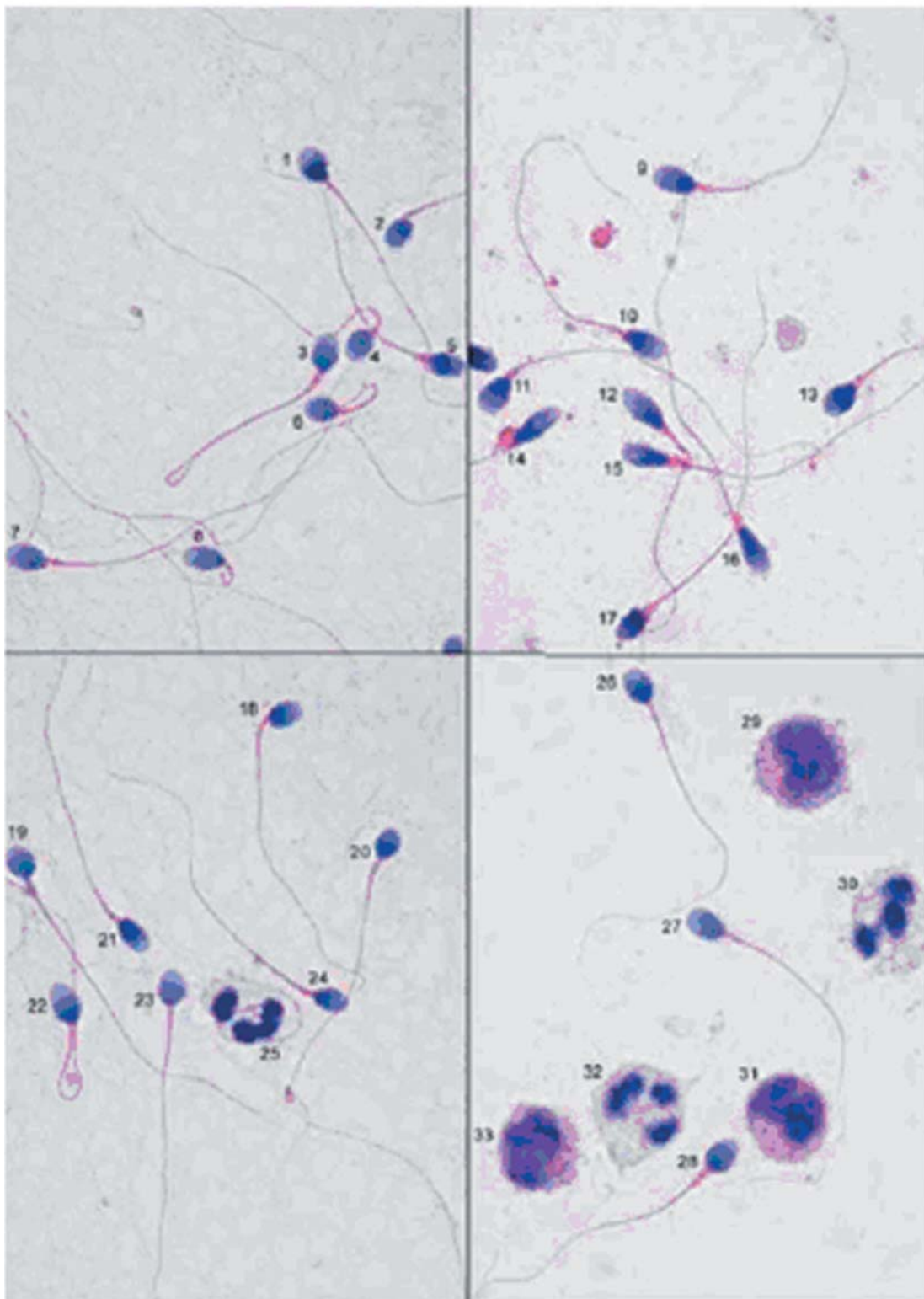
Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil.

Морфологическая оценка сперматозоидов на вклейке 10.

Сперматозоид	Форма головки	Комментарии к головке	Комментарии к средней части	Комментарии к основной части	Суммарная классификация сперматозоида	Комментарии
1	нормальная			асимметрия		аномальный
2	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
3	аномальная	грушевидная			аномальный	
4	нормальная				нормальный	
5	нормальная		утолщенная		аномальный	
6	аномальная	грушевидная	>1/3	изогнутость	аномальный	>1/3
7	нормальная				нормальный	
8	нормальная				нормальный	
9	нормальная	3 вак			аномальный	
10	аномальная	коническая	утолщенная, >1/3		аномальный	>1/3
11	аномальная	коническая,	<40% акр	изогнутость	аномальный	
12						моноцит
13						полиморф
14						полиморф
15						моноцит
16	аномальная	коническая			аномальный	
17	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
18	нормальная				нормальный	
19	нормальная				нормальный	
20	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
21	аномальная	аморфная			аномальный	
22	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
23	аномальная	коническая	утолщенная	изогнутость	аномальный	
24		наложение				нет оценки
25	аномальная	коническая			аномальный	
26	аномальная	аморфная	утолщенная, >1/3		аномальный	>1/3
27	нормальная		утолщенная		аномальный	
28	аномальная	аморфная	утолщенная		аномальный	
29	аномальная	вакуоли в постакросомной области			аномальный	
30	аномальная		утолщенная		аномальный	
31	аномальная		утолщенная	заскрученная	аномальный	
32	нормальная		утолщенная		аномальный	
33		наложение				нет оценки
34		наложение				нет оценки
35	аномальная	аморфная, нет акросомы	утолщенная		аномальный	
36	нормальная	<40% акр			аномальный	
37	аномальная	грушевидная	утолщенная	двойная	аномальный	
38	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
39	нормальная		утолщенная		аномальный	
40	аномальная	<40% акр			аномальный	
41	аномальная		утолщенная	изогнутость	аномальный	
42	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
43	нормальная	2 вак, <40% акр			аномальный	
44	нормальная				нормальный	
45	аномальная		утолщенная, чрезмерная резидуальная капля		аномальный	>1/3
46	аномальная		утолщенная		аномальный	

Вклейка 11

10 микрон



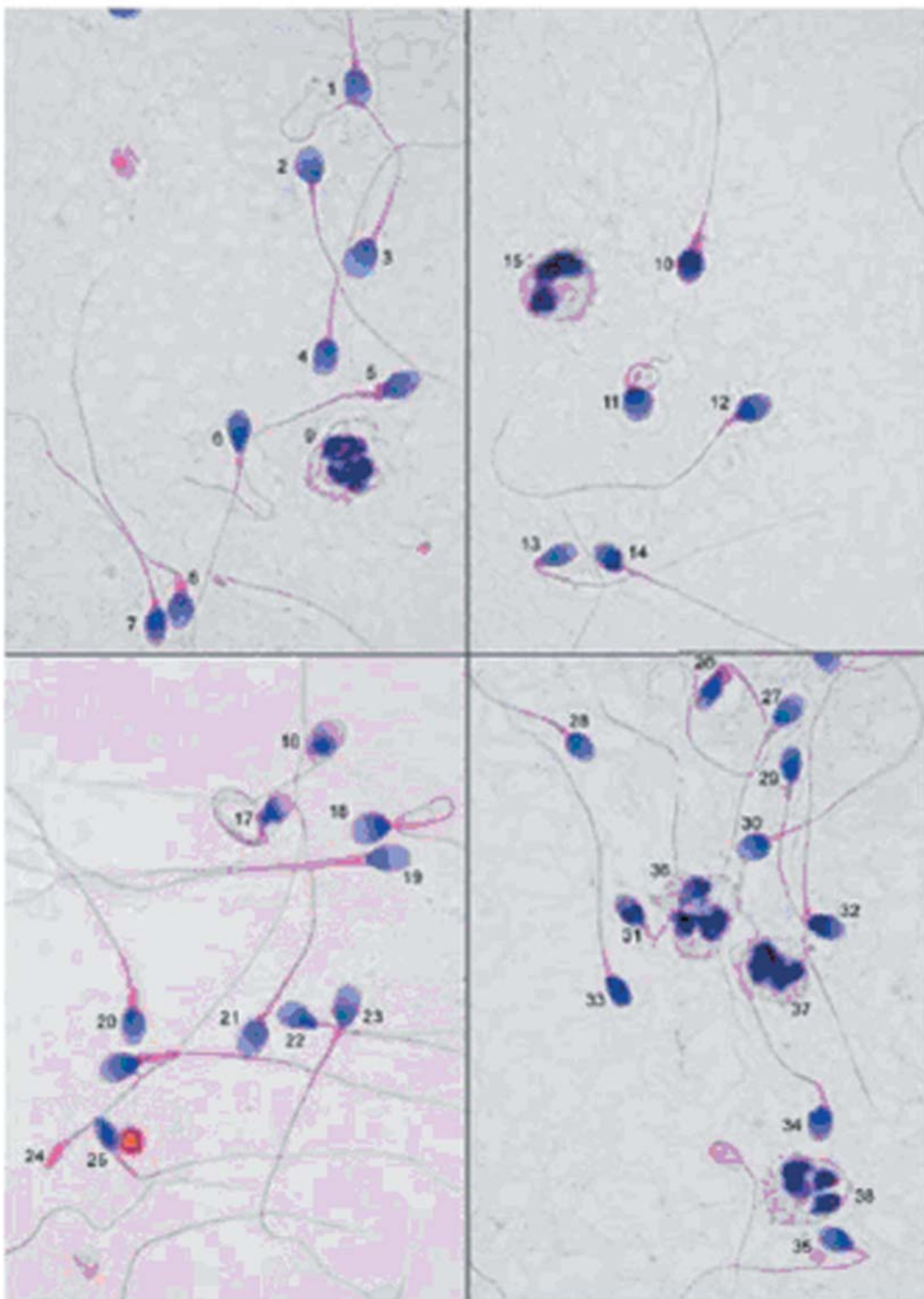
Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil.

Морфологическая оценка сперматозоидов на вклейке 11.

Сперматозоид	Форма головки	Комментарии к головке	Комментарии к средней части	Комментарии к основной части	Суммарная классификация сперматозоида	Комментарии
1	аномальный		наложение		аномальный	
2	аномальный		наложение		аномальный	
3	нормальный		утолщенная	петлеобразный	аномальный	
4	нормальный				нормальный	
5	аномальный	>2 вак, <40% акр	утолщенная		аномальный	
6	нормальный			петлеобразный	аномальный	
7	аномальный		наложение		аномальный	
8	нормальный			петлеобразный	аномальный	
9	аномальный	>70% акр, конический			аномальный	
10	аномальный	конический			аномальный	
11	нормальный		утолщенная		аномальный	
12	аномальный	конический			аномальный	
13	нормальный	<40% акр	утолщенная		аномальный	
14	аномальный	конический	утолщенная, ERC		аномальный	>1/3
15	аномальный	конический	утолщенная		аномальный	
16	аномальный	конический			аномальный	
17	аномальный	аморфный	утолщенная		аномальный	
18	нормальный				нормальный	
19	нормальный				аномальный	
20	аномальный				аномальный	
21	аномальный				аномальный	
22	нормальный	>70% акр		петлеобразный	аномальный	
23	нормальный				нормальный	
24	нормальный				нормальный	
25						полиморф
26	нормальный				нормальный	
27	нормальный				нормальный	
28	нормальный	>70% акр			аномальный	
29						моноцит
30						полиморф
31						моноцит
32						полиморф
33						моноцит

Вклейка 12

10 микрон



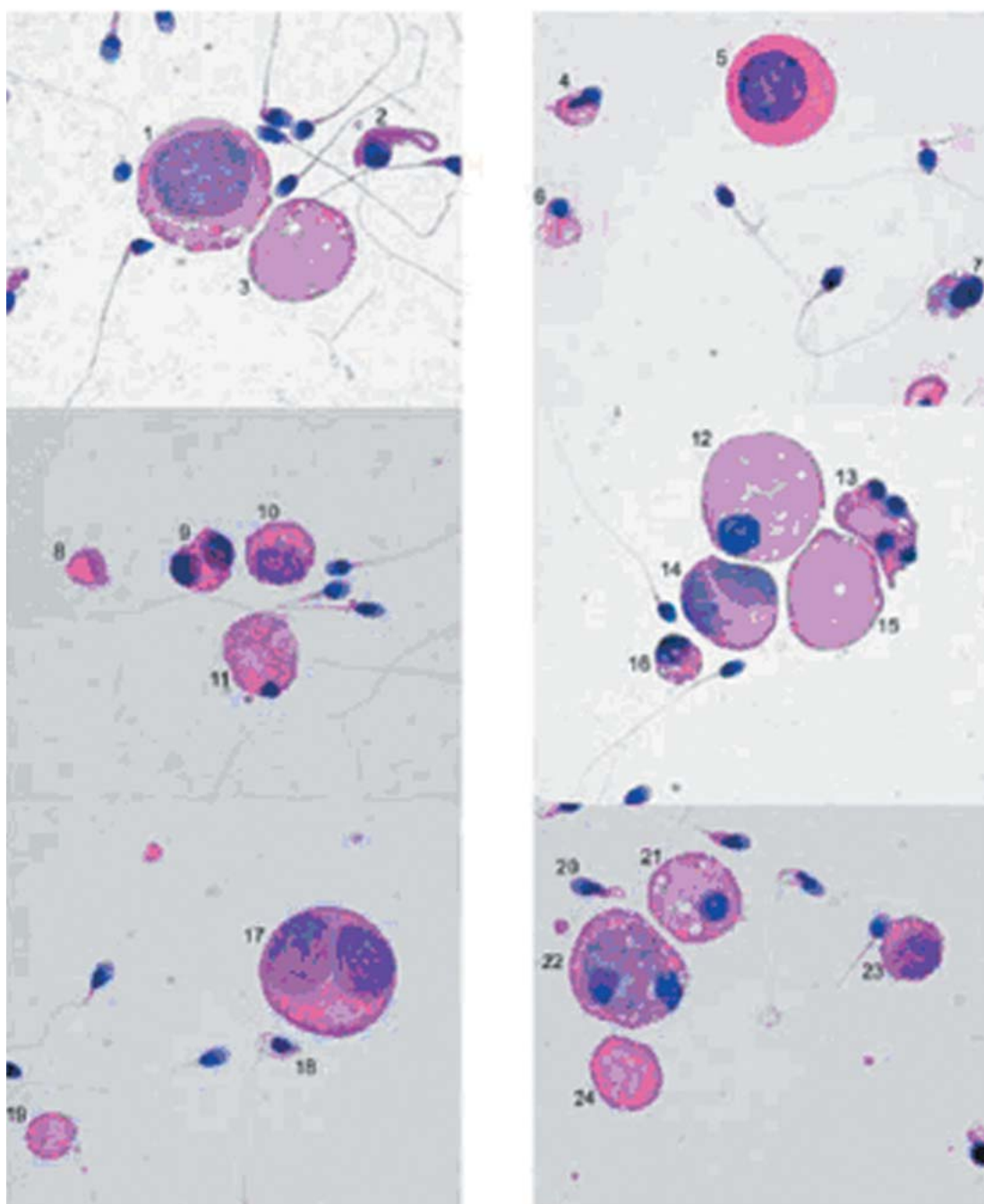
Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil.

Морфологическая оценка сперматозоидов на вклейке 12.

Сперматозоид	Форма головки	Другие комментарии к головке	Комментарии к средней части	Комментарии к основной части	Суммарная классификация сперматозоида	Комментарии
1	нормальная	>70% акр			аномальный	
2	аномальная				аномальный	
3	аномальная	>70% акр			аномальный	
4	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
5	аномальная		утолщенная		аномальный	
6	аномальная	коническая			аномальный	
7		нет фокуса	утолщенная			нет оценки
8	аномальная		утолщенная, изогнутость		аномальный	
9						дегенерирующий лейкоцит
10	аномальная		утолщенная		аномальный	
11	аномальная	круглая		скрученная	аномальный	
12	нормальная				нормальный	
13	аномальная	коническая	изогнутость		аномальный	
14	аномальная		наложение		аномальный	
15						полиморф
16	аномальная	аморфная			аномальный	
17	аномальная			скрученная	аномальный	
18	аномальная		утолщенная	скрученная	аномальный	
19	нормальная			двойная	аномальный	
20	аномальная		утолщенная		аномальный	
21		наложение				нет оценки
22	аномальная	грушевидная			аномальный	
23	нормальная				нормальный	
24	аномальная				аномальный	ацефалический
25	аномальная	аморфная		изогнутость	аномальный	
26	аномальная	аморфная	утолщенная, изогнутость		аномальный	
27	нормальная		утолщенная		аномальный	
28	нормальная				нормальный	если основная часть нормальная
29	аномальная	коническая			аномальный	
30	аномальная	круглая			аномальный	
31	нормальная		изогнутость	наложение		нет оценки
32	нормальная		утолщенная, изогнутость		аномальный	
33	аномальная				аномальный	
34	аномальная				аномальный	
35	нормальная		изогнутость		аномальный	
36						полиморф
37						полиморф
38						полиморф

Вклейка 13

15 микрон



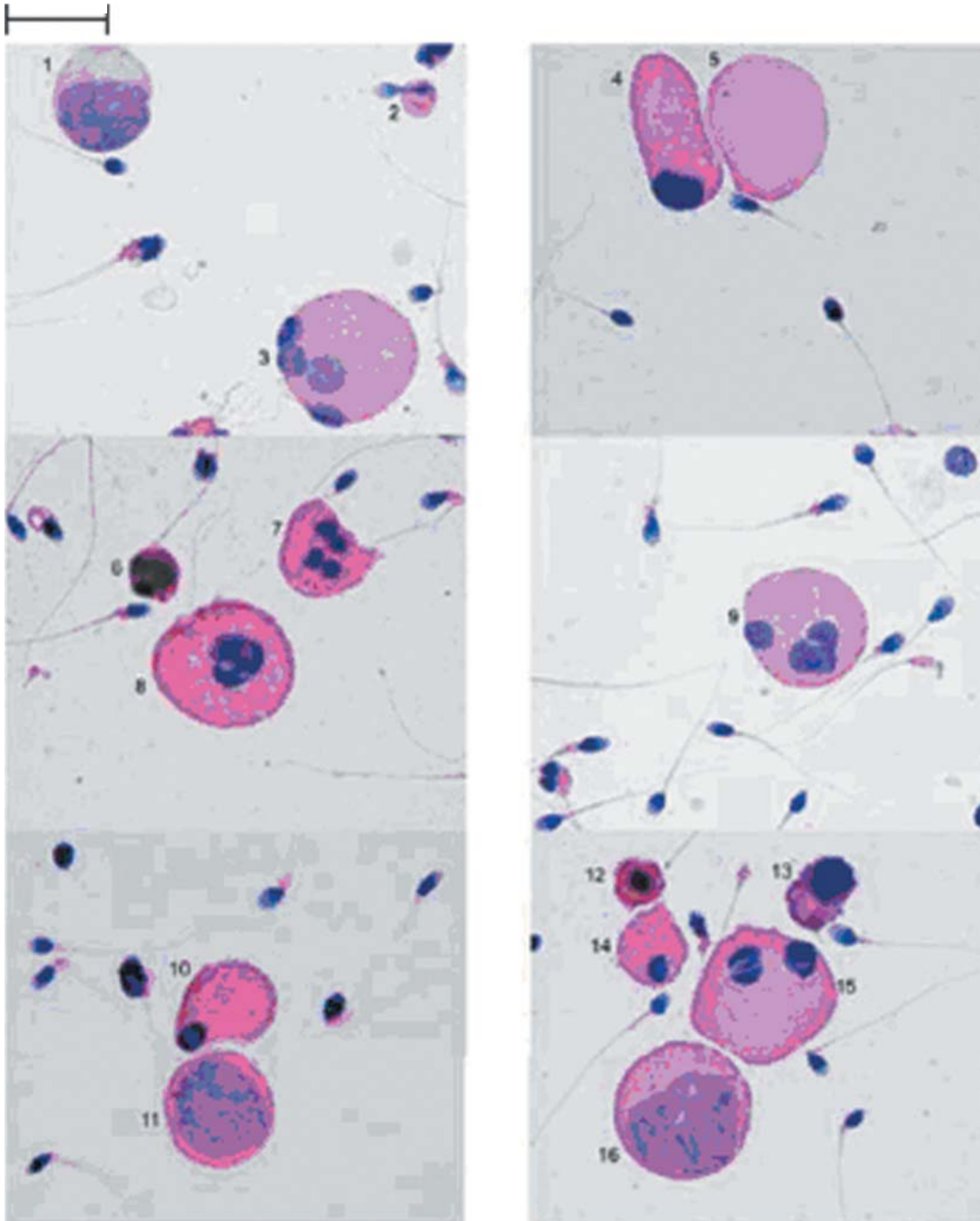
Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil.

Оценка клеток на вклейке 13

Клетка	Тип клетки
1	Макрофаг
2	Аномальный сперматозоид
3	Цитоплазма
4	Аномальный сперматозоид
5	Сперматоцит
6	Аномальный сперматозоид
7	Аномальный сперматозоид? Потерянная головка на цитоплазме?
8	Цитоплазма
9	Дегенерирующая (неразделившаяся) сперматида
10	Сперматоцит
11	Дегенерирующая сперматида
12	Сперматида
13	Дегенерирующая сперматида
14	Неразделившийся сперматоцит
15	Цитоплазма
16	Дегенерирующая сперматида
17	Дробящийся (неразделившийся) сперматоцит
18	Аномальный сперматозоид
19	Цитоплазма
20	Аномальный сперматозоид
21	Сперматида
22	Фагоцитирующий макрофаг
23	Сперматоцит
24	Цитоплазма

Вклейка 14

15 микрон



Микрофотографии с любезного согласия С. Brazil.

Оценка клеток на вклейке 14

Клетка	Тип клетки
1	Макрофаг
2	Аномальный сперматозоид
3	(Делящаяся) сперматида
4	(Делящаяся) сперматида
5	Цитоплазма
6	Не поддается классификации
7	Дегенерирующая сперматида
8	Дегенерирующая сперматида (?)
9	Дегенерирующая сперматида
10	Дегенерирующая сперматида
11	Макрофаг
12	Дегенерирующая сперматида
13	Дегенерирующая сперматида
14	Дегенерирующая сперматида
15	Дегенерирующая сперматида
16	Макрофаг

2.17 Анализ морфологии сперматозоидов на окрашенных мазках

2.17.1 Оценка морфологии нормального сперматозоида

Необходимо определять процент нормальных сперматозоидов. С точки зрения парадигмы о морфологии нормального сперматозоида рассматривают его функциональные области. Нет необходимости различать все вариации размеров головки и ее форм или варианты дефектов шейки и жгутика.

Морфологическую оценку следует проводить для каждого сперматозоида, поддающегося оценке, в нескольких систематически отобранных полях зрения на предметном стекле для того, чтобы предотвратить необъективный отбор каких-либо отдельных сперматозоидов.

- Просмотрите предметное стекло в световом микроскопе на увеличении $\times 1000$ под иммерсионным маслом.
- Оцените все сперматозоиды в каждом поле зрения, перемещаясь от одного поля зрения к другому.
- Оцените по крайней мере 200 сперматозоидов в каждом дубликате (на втором предметном стекле), для достижения приемлемо низкой статистической ошибки (см. Бокс 2.5).
- Подсчитайте число нормальных и аномальных сперматозоидов с помощью лабораторного счетчика.

- Повторите оценку по крайней мере 200 сперматозоидов предпочтительно на втором предметном стекле, но можно и на том же самом (см. Бокс 2.5).
- Сравните процент морфологически нормальных сперматозоидов при двух независимых оценках.
- Рассчитайте среднее и различие между процентными значениями нормальных форм при повторных измерениях.
- Определите приемлемость различий из Табл. 2.1. или Рис. А 7.2, Приложение 7. (Каждый показывает максимальное различие между двумя процентами, которое можно ожидать в 95% образцах только из-за статистической ошибки.)
- Если различие между процентными значениями приемлемо, запишите средний процент морфологически нормальных сперматозоидов. Если различие слишком велико, повторите оценку на том же предметном стекле (см. Бокс 2.6).
- Запишите среднее значение морфологически нормальных форм сперматозоидов как ближайшее среднее число.

Важно 1: Оценивайте только интактные сперматозоиды, имеющие головки и жгутики (см. Раздел 2.7.3), так как только интактные сперматозоиды используют для расчета концентрации клеток. Не учитывайте незрелые половые клетки (округлые).

Важно 2: Не оценивайте перекрывающиеся сперматозоиды и такие, которые лежат головкой на жгутике; такие клетки невозможно проанализировать правильно. Они не должны присутствовать на хорошо приготовленных мазках (см. Раздел 2.13.2.1), но это может случаться, когда присутствует клеточный дебрис или большое количество зернистого материала (например, вязкость эякулята: см. Раздел 2.13.2.3). Такие образцы следует отмывать (см. Раздел 2.13.2.4), а предметные стекла оценивать до окрашивания.

2.17.2 Примеры с решениями

Пример 1. Процент сперматозоидов с нормальной морфологией при повторных расчетах 200 сперматозоидов равны 18 и 9. Округленное среднее значение 14%, различие 9%. Из Табл. 2.1 видно, что при среднем 14% допустима разница не более 7%. Так как наблюдаемое различие превышает ожидаемое, результаты расчета признаются недействительными и предметные стекла оценивают заново.

Пример 2. Процент сперматозоидов с нормальной морфологией при повторных расчетах 200 клеток равен 10 и 14. Округленное среднее значение равно 12%, разница — 4%. Из Табл. 2.1 видно, что для среднего 12% допустимо различие не более 7%. Так как наблюдаемое различие не превышает допустимого значения, результаты признают пригодными и записывают среднее значение, а именно 12% морфологически нормальных форм сперматозоидов.

2.17.3 Минимальное референсное значение

Минимальным референсным значением нормальных форм считают 4% (5-й перцентиль, 95% доверительный интервал 3.0–4.0).

Комментарий: Общее число морфологически нормальных сперматозоидов в эякуляте имеет биологическое значение. Его получают умножением общего числа сперматозоидов в эякуляте (см. Раздел 2.8.7) на процент нормальных форм.

2.17.4 Оценка морфологии аномального сперматозоида

Категоризация всех аномальных форм сперматозоидов может быть полезна для диагностических и исследовательских целей. Если необходимо, отметьте природу дефектов и рассчитайте процент сперматозоидов с дефектами головки (%H), шейки (%M) или жгутика (%P), а также сперматозоидов с резидуальными цитоплазматическими каплями (%C).

Можно использовать многокнопочный счетчик, одна кнопка для нормальных форм, одна для аномальных и по одной для каждой из четырех типов аномалии (H, M, P, C). Такие счетчики позволяют подсчитать каждый сперматозоид только один раз, а каждый из типов аномалии оценивается отдельно.

- При финальной оценке 400 сперматозоидов можно получить процент нормальных и аномальных сперматозоидов (эти два числа следует доводить до 100%), а также процент каждого типа аномалии, то есть %H, %M, %P and %C (эти числа не следует доводить до 100%).
- Процент сперматозоидов в этих классах аномалии получен делением общего числа аномальных сперматозоидов со специфическими дефектами на общее число нормальных и аномальных сперматозоидов, умноженное на 100. Эти числа также можно использовать для расчета индексов множественных дефектов (см. Раздел 3.1).

2.17.5 Примеры с решениями

Пример 1. Из 200 сперматозоидов, рассчитанных с помощью шестикнопочного счетчика при первом анализе 42 сперматозоида считают нормальными и 158 аномальными. Из 158 аномальных сперматозоидов 140 имеют дефекты головки, 102 — дефекты шейки, 30 — дефекты жгутика и 44 содержат резидуальную каплю. Результаты повторного анализа — 36 нормальные и 164 аномальные сперматозоиды, из которых 122 имеют дефекты головки, 108 — дефекты шейки, 22 — аномалии жгутика и 36 имеют резидуальные цитоплазматические капли.

Только нормальную категорию сравнивают на приемлемость различий при повторных вычислениях. Повтор 1 имеет 21% нормальных сперматозоидов, при повторе 2 — 18%. Средним значением является 19,5% (округляем до 20%), а различие составляет 3%. Из Таблицы 2.1, видно, что при среднем 20% следует ожидать различие не выше 8%. Так как выявленное различие меньше этого значения, результат следует принять и среднее значение записать: нормальных форм $(42 + 36)/400 = 20\%$, аномальных головок $(140 + 122)/400 = 66\%$, аномальных шеек

$(102+108)/400=53\%$, аномальных жгутиков $(30+22)/400=13\%$ и процент сперматозоидов с аномальными резидуальными каплями $(44+36)/400=20\%$.

Важно: Эти категории не должны превышать 100%, так как каждый тип аномалии подсчитывается отдельно, а некоторые сперматозоиды имеют множественные дефекты.

Комментарий: Более детальный анализ аномальных сперматозоидов с различными индексами, учитывающими число аномалий в каждой области на аномальный сперматозоид, приведен в Разделе 3.1.1.

2.17.6 Оценка особых дефектов сперматозоидов

Иногда многие сперматозоиды могут иметь особые структурные дефекты. Например, акросома может не развиваться, что приводит к дефекту — круглые головки, или глобулозооспермия. Если во время спермиогенеза базальная пластинка не прикрепляется к ядру на противоположной стороне акросомы, головка теряется и только жгутики можно наблюдать в эякуляте (ацефалические сперматозоиды).

Важно 1: Ацефалические (только жгутики) сперматозоиды не подсчитывают как дефект головки, так как такие головки не содержат хроматина или структур, лежащих до базальной пластинки внутри головки.

Важно 2: Так как ацефалические сперматозоиды и свободно лежащие головки не подсчитывают как сперматозоиды (определяемые как имеющие головку и жгутик, см. Раздел 2.7.3), их не следует рассматривать как аномалии сперматозоидов.

Мужчины, которые имеют сперматозоиды с одним из таких дефектов, обычно бесплодны. Такие случаи редки, но важно, чтобы их корректно идентифицировали и записывали. Таким образом, необходимо сообщать о присутствии особых дефектов сперматозоидов, например, свободные головки, ацефалия (свободные жгутики), головки без акросомы.

Если обнаружено много таких дефектов, их распространенность по сперматозоидам может быть определена. Если N есть число клеток с дефектами, рассчитанное на одном и том же числе полей зрения на 400 сперматозоидов, а S есть концентрация сперматозоидов (10^6 на мл), то концентрация (C) дефектов (10^6 на мл) может быть рассчитана по формуле $C = S \times (N/400)$.

2.18 Оценка лейкоцитов в сперме

Лейкоциты, преимущественно полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофилы), присутствуют в большинстве образцов эякулята человека (Tomlinson et al., 1993; Johanisson et al., 2000). Они могут быть дифференцированы от сперматид и сперматоцитов на мазке спермы, окрашенном по Папаниколау (см. Раздел 2.14.2). Дифференцировка основана на различиях в окрашивании и в размерах ядра и его формы (Johanisson et

al., 2000) (см. вклейки 6, 10, 11, 12, 13 и 14). Полиморфноядерные лейкоциты можно легко спутать морфологически с мультиядерными (многоядерными) сперматидами, но окрашивание лимфоцитов более голубое, в отличие от более розовой окраски сперматид (Johanisson et al., 2000). Размер ядра также может помочь в идентификации: ядра моноцитов имеют широкие вариации в размерах, от примерно 7 мкм у лимфоцитов до 15 мкм у макрофагов. Эти размеры являются только рекомендательными, так как дегенерация и деление нарушают размеры ядер.

Существует несколько других методов для классификации популяции лейкоцитов в сперме. Так как пероксидаза-положительные гранулоциты являются преобладающими формами лейкоцитов в сперме, рутинный анализ пероксидазной активности полезен как первоначальная скрининговая техника (Wolff, 1995; Johanisson et al., 2000) (см. Раздел 2.18.1). Лейкоциты могут быть в дальнейшем с помощью затратных по времени и более дорогостоящих иммуноцитохимических методов дифференцированы от общих лейкоцитарных и спермальных антигенов (Номук et al., 1990; Eggert-Kruse et al., 1992) (см. Раздел 3.2).

2.18.1 Окраска пероксидазных клеток с помощью орто-толуидина

Этот тест быстрый и недорогой, а также полезный как первоначальный скрининг на гранулоциты.

2.18.1.1 Принцип

Традиционно, лейкоциты в сперме человека подсчитывают после гистохимической процедуры, позволяющей идентифицировать фермент пероксидазу, который характеризует гранулоциты (Рис. 2.14). Этот метод имеет преимущество по относительной простоте выполнения, но не позволяет определить:

- активированные *полиморфы*, из которых удаляются гранулы;
- другие типы лейкоцитов, такие как лимфоциты, макрофаги и моноциты, которые не содержат пероксидазу.

Этот тест может быть полезен для идентификации полиморфноядерных лейкоцитов от мультиядерных сперматид, которые не содержат пероксидазы (Johanisson et al., 2000). Анализ ниже основан на данных Nahoum & Cardozo (1980). Набор для него коммерчески доступен.

2.18.1.2 Реагенты

1. Фосфатный буфер, 67 ммоль/л, рН 6,0: растворите 9,47 г гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4) в 1000 мл дистиллированной воды и 9,08 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4) в 1000 мл дистиллированной воды. Добавьте один раствор к другому (приблизительно 12 мл Na_2HPO_4 к 88 мл KH_2PO_4) до достижения рН, равного 6,0.
2. Раствор насыщенного хлорида аммония (NH_4Cl): добавьте 250 г NH_4Cl к 1000 мл дистиллированной воды.
3. Na_2EDTA 148 ммоль/л: растворите 50 г/л в фосфатном буфере (рН 6,0), приготовленном на этапе 1.
4. Субстрат: растворите 2,5 мг о-толуидина в 10 мл 0,9% (9 г/л) соли.

5. Перекись водорода (H_2O_2) 30% (v/v): промышленная.
6. Рабочий раствор: к 9 мл субстрата о-толуидина добавьте 1 мл насыщенного раствора NH_4Cl , 1 мл 148 ммоль/л Na_2EDTA и 10 мкл 30% (v/v) H_2O_2 и хорошо перемешайте. Раствор можно использовать в течение 24 ч после приготовления.

Важно: Международное агентство по исследованию рака (IARC, 1982) установило, что обращаться с орто-толуидином следует очень аккуратно, так как он имеет канцерогенный риск для человека. Соблюдайте меры предосторожности (см. Приложение 2).

2.18.1.3 Процедура

1. Тщательно перемешайте образец спермы (см. Бокс 2.3).
2. Возьмите 0,1 мл аликвоту спермы и смешайте ее с 0,9 мл рабочего раствора (разведение 1+9 (1:10)).
3. Аккуратно перемешайте суспензию спермы в течение 10 сек на шейкере и инкубируйте ее при комнатной температуре в течение 20–30 мин. Альтернативно, размешивайте ее непрерывно на качающейся системе для пробирок.
4. Перемешайте снова образец спермы до взятия повторной аликвоты и смешайте ее с рабочим раствором, как описано выше.

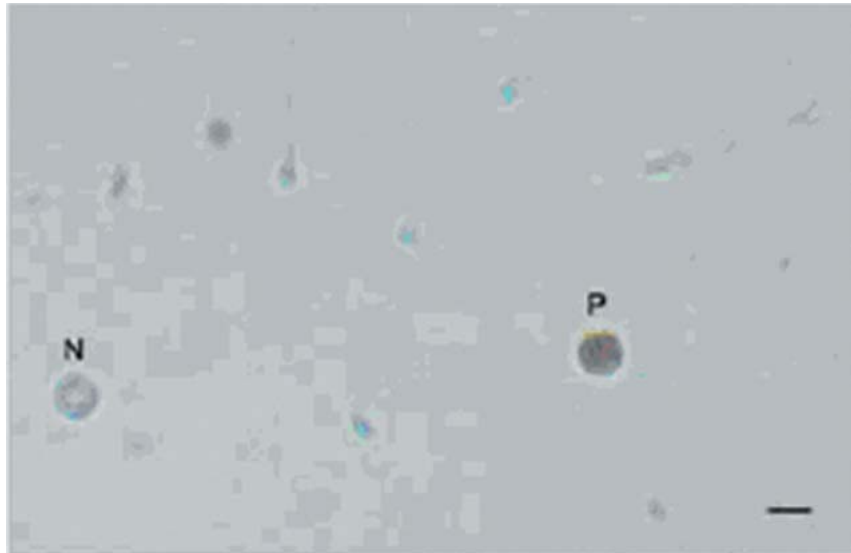
2.18.1.4 Оценка числа пероксидаза-положительных клеток с помощью камеры гемоцитометра

1. После 20–30 мин перемешайте суспензии спермы снова и наполните каждую сторону гемоцитометра первым повтором препарата.
2. Удерживайте гемоцитометр горизонтально не менее 4 мин при комнатной температуре во влажной камере (то есть влажная фильтровальная бумага в закрытой чашке Петри) для предотвращения высыхания и чтобы позволить клеткам осесть.
3. Оцените камеру в фазово-контрастном микроскопе при увеличении $\times 200$ или $\times 400$.
4. Подсчитайте не менее 200 пероксидаза-положительных клеток в каждом повторном расчете для того, чтобы достичь приемлемо низкой ошибки (см. Бокс 2.7 и Табл. 2.2). Пероксидаза-положительные клетки окрашиваются в коричневый цвет, пероксидаза-отрицательные не окрашиваются (см. Рис. 2.14).
5. Оценивайте одну камеру квадрат за квадратом и продолжайте подсчет до достижения 200 пероксидаза-положительных клеток, все квадраты должны быть оценены. Расчет должен быть сделан только на целых квадратах; не останавливайтесь на середине квадрата.
6. Запишите число оцененных квадратов при идентификации не менее 200 пероксидаза-положительных клеток. То же самое число квадратов должно быть подсчитано в другой камере гемоцитометра.
7. Подсчитывайте число пероксидаза-положительных клеток и квадратов с помощью лабораторного счетчика.

8. Настройте вторую камеру гемоцитометра и произведите подсчет того же числа квадратов, что и при первом расчете, даже если будет менее 200 пероксидаза-положительных клеток.
9. Рассчитайте сумму и различие для двух подсчетов пероксидаза-положительных клеток.
10. Определите приемлемость различий из Табл. 2.5. или по Рис. А7.1, Приложение 7. (Каждое показывает максимальное различие между двумя процентными значениями, которые, как ожидается, попадут в 95% доверительный интервал).
11. Если различие приемлемо, подсчитайте концентрацию (см. Раздел 2.18.1.5). Если различие слишком велико, подготовьте два новых разведения и повторите подсчет (см. Бокс 2.10).
12. Запишите среднюю концентрацию пероксидаза-положительных клеток, округлив до двух значимых цифр.
13. Рассчитайте общее число пероксидаза-положительных клеток в эякуляте (см. Комментарий после Раздела 2.18.1.8).

Рис. 2.14 Пероксидаза-положительные и пероксидаза-отрицательные клетки в сперме человека

Пероксидаза-положительные гранулоциты (P) (коричневые) и пероксидаза-отрицательные округлые клетки (N). Масштабная шкала 10 мкм.



Микрофотография любезно предоставлена Т. G.Соорег.

2.18.1.5 Расчет концентрации пероксидаза-положительных клеток в сперме

Концентрацию пероксидаза-положительных клеток в сперме рассчитывают по их числу (N), поделенному на объем суммарного количества оцененных квадратов (n) при повторных измерениях (где объем сетки камеры составляет 100 нл), умноженному на коэффициент разведения.

При разведении 1+9 (1:10) концентрация составляет $C = (N/n) \times (1/100) \times 10$ клеток на нл = $(N/n) \times (1/10)$ клеток на нл. Таким образом (N/n) де-

лится на 10 для получения концентрации пероксидаза-положительных клеток в нл (10^6 клеток в мл).

Когда все девять квадратов в каждой камере гемоцитометра оценены, общее число пероксидаза-положительных клеток делится на общий объем обеих камер (1,8 мкл) и умножается на коэффициент разведения (10) для получения концентрации клеток на мкл (тысяча клеток в мл).

Важно: Такая процедура может быть использована для расчета концентрации округлых клеток, когда общее число подсчитанных округлых клеток (пероксидаза-положительных и пероксидаза-отрицательных) используется для N при вычислении.

2.18.1.6 Чувствительность метода

Если обнаружено менее 200 пероксидаза-положительных клеток в камере, ошибка расчета будет превышать 5%. Когда менее 400 пероксидаза-положительных клеток обнаружено во всех квадратах обеих камер, записывайте ошибку расчета для подсчитанного числа клеток (см. Табл. 2.2).

Если менее 25 пероксидаза-положительных клеток подсчитано в каждой камере, концентрация будет $<277\ 000$ клеток в мл; это нижний предел для ошибки расчета 20%, когда все девять квадратов усовершенствованной камеры Нэйбауера проанализированы и использовано разведение 1+9 (1:10) (Соорер et al., 2006). Запишите число наблюдаемых пероксидаза-положительных клеток с комментарием «Слишком мало клеток для точного определения концентрации ($<277\ 000$ /мл)».

Комментарий: Отсутствие пероксидаза-положительных клеток в оцениваемой аликвоте не обязательно означает, что они отсутствуют в тестируемом образце.

2.18.1.7 Примеры с решениями

Пример 1. При разведении 1+9 (1:10) подсчет 1 показал 60 пероксидаза-положительных клеток в девяти квадратах, при подсчете 2—90 клеток в девяти квадратах. Суммарное значение (60+90) составляет 150 в 18 квадратах, различие (90—60) равно 30. Из Табл. 2.5 видно, что ожидаемое различие (24) превышает рассчитанное, следовательно, результат признан неприемлемым и необходимо провести дополнительные подсчеты.

Пример 2. При разведении 1+9 (1:10) подсчет 1 показал 204 пероксидаза-положительных клеток в пяти квадратах, при подсчете 2 обнаружено 198 пероксидаза-положительных клеток в пяти квадратах. Сумма составляет (204+198) 402 в десяти квадратах, различие (204—198) — 6. Из Табл. 2.5 видно, что различие (39) меньше рассчитанного, следовательно, полученное значение приемлемо.

Концентрация пероксидаза-положительных клеток в образце при разведении 1+9 (1:10) составляет $C = (N/n) \times (1/10)$ клеток в нл или $(402/10)/10 = 4,02$ клеток/нл, или $4,0 \times 10^6$ клеток в мл (округление до двух значимых цифр).

Пример 3. При разведении 1+9 (1:10) подсчет 1 показал содержание 144 пероксидаза-положительных клеток в девяти квадратах, при под-

счете 2 — 162 пероксидаза-положительных клеток в девяти квадратах. Суммарное значение (144+162) составляет 306 в 18 квадратах, различие (162–144) равно 18. Из Табл. 2.5, как оказалось, различие меньше рассчитанного (34), таким образом, значение приемлемо.

Когда все девять квадратов оценены в каждой камере, концентрация в образце при разведении 1+9 (1:10) составляет $C = (N/1,8) \times 10$ клеток в мкл = $(306/1,8) \times 10 = 1700$ клеток в мкл или $1,7 \times 10^6$ клеток в мл (округление до двух значимых цифр). Так как менее 400 клеток подсчитано, записываем ошибку расчета для 306 клеток, полученную из Табл. 2.2 (приблизительно 6%).

Пример 4. При разведении 1+9 (1:10) не обнаружена ни одна пероксидаза-положительная клетка ни в одной аликвоте. Так как менее 25 пероксидаза-положительных клеток найдено во всех девяти квадратах, концентрация составляет <277 000 в мл, пишут «Пероксидаза-положительные клетки в образце не найдены. Слишком мало клеток для более точной оценки концентрации (<277 000/мл)».

2.18.1.8 Минимальное референсное значение

В настоящее время минимальное референсное значение для пероксидаза-положительных клеток в эякуляте фертильных мужчин отсутствует. В качестве пороговой величины остается значение $1,0 \times 10^6$ пероксидаза-положительных клеток на 1 мл эякулята.

Комментарий 1: Общее число пероксидаза-положительных клеток в эякуляте может отражать тяжесть воспалительного заболевания (Wolff, 1995). Значение получают умножением концентрации пероксидаза-положительных клеток на объем эякулята.

Комментарий 2: Значения пероксидаза-положительных клеток у фертильных мужчин варьирует от $0,5 \times 10^6$ до $1,0 \times 10^6$ полиморфно-ядерных (PMN) лейкоцитов на мл или от 1×10^6 до 2×10^6 общего числа лейкоцитов на мл (Wolff, 1995). Предыдущие издания данного руководства предлагали значение 1×10^6 лейкоцитов на мл в качестве порогового для лейкоцитоспермии. Некоторые исследователи считают такое значение слишком низким (Wolff, 1995), в то время как другие — слишком высоким (Sharma et al., 2001; Punab et al., 2003), зависящим от рассматриваемой конечной точки (оценка качества спермы, результаты оплодотворения in vitro, присутствие бактерий, ответ сперматозоидов на свободные радикалы кислорода).

Комментарий 3: Чрезмерное количество лейкоцитов в эякуляте (лейкоцитоспермия, пиоспермия) может быть связано с инфекцией и плохим качеством спермы.

Комментарий 4: Лейкоцит-зависимое повреждение сперматозоидов зависит от общего числа лейкоцитов в эякуляте и числа лейкоцитов относительно количества сперматозоидов.

Комментарий 5: Лейкоциты могут снижать подвижность сперматозоидов и нарушать целостность ДНК посредством оксидативного воздействия (см. Раздел 4.1). Однако наблюдаемый уровень лейкоци-

тарного повреждения зависит от факторов, которые невозможно предположить из показателей образца эякулята, такие как причина, время и анатомическая локализация инфильтрации лейкоцитов, а также природа таких лейкоцитов и их нахождение в активированном состоянии (Tomlinson et al., 1993; Aitken & Baker, 1995; Rossi & Aitken, 1997).

2.19 Оценка незрелых половых клеток в сперме

Незрелые половые клетки в эякуляте представлены круглыми сперматидами и сперматоцитами, редко — сперматогониями. Их можно обнаружить на окрашенных мазках спермы, однако трудно отдифференцировать от дегенерирующих клеток.

Сперматиды и сперматоциты могут быть отдифференцированы от лейкоцитов на мазках спермы, покрашенных по Папаниколау (Johanisson et al., 2000) (см. Раздел 2.14.2). Идентификация основана на разнице в окраске, размере ядра и его форме (см. Вклейки 6, 10, 11, 12, 13 и 14), по отсутствию внутриклеточной пероксидазы (см. Раздел 2.18) и лейкоцит-специфичных антигенов (см. Раздел 3.2). Мультиядерные сперматиды можно по морфологии легко спутать с полиморфноядерными лейкоцитами, однако первые окрашиваются в розовый цвет, в отличие от более голубых полиморфноядерных лейкоцитов (Johanisson et al., 2000). Округлые сперматиды можно идентифицировать с помощью окрашивания, специфичного к развивающейся акросоме (Couture et al., 1976), лектинам (см. Раздел 4.4.1) или специфическим антителам (Номук et al., 1990; Ezeh et al., 1998).

Определение размера ядра может также помочь в идентификации: сперматогония (очень редко встречающегося в сперме), имеющего диаметр ядра приблизительно 8 мкм, сперматоциты имеют ядро приблизительно 10 мкм, а сперматиды — 5 мкм в диаметре. Эти размеры очень приближены, так как дегенерация и процесс деления влияют на размер ядер.

2.20 Оценка антител, покрывающих сперматозоиды

Если в эякуляте обнаружена агглютинация сперматозоидов (то есть подвижные сперматозоиды приклеиваются друг к другу головка к головке, жгутик к жгутику или смешанным образом) (см. Раздел 2.4.4), это может быть вызвано присутствием антиспермальных антител.

Комментарий 1: Антиспермальные антитела могут присутствовать и без агглютинации сперматозоидов; точно также агглютинация может быть вызвана факторами, отличными от антиспермальных антител.

Комментарий 2: Только присутствие антиспермальных антител недостаточно для диагноза аутоиммунного заболевания. Необходимо показать, что антитела серьезно повреждают функцию сперматозоидов; это обычно делают с помощью теста на пенетрацию сперматозоидами цервикальной слизи (см. Раздел 3.3). Антитела также могут препятствовать связыванию сперматозоидов с зоной пеллюцида и акросомной реакции.

Антиспермальные антитела (АСАТ) в сперме находятся исключительно в виде иммуноглобулинов двух классов: IgA и IgG. Антитела IgM из-за их большого размера редко встречаются в эякуляте. Антитела IgA имеют более важное клиническое значение, чем IgG (Kremer & Jager, 1980). Оба класса антител можно обнаружить на клетках сперматогенеза или в биологических жидкостях с помощью скрининговых тестов.

- Тесты на антитела на сперматозоидах («прямой тест»). Два прямых теста описаны здесь: смешанная антиглобулиновая реакция (MAR-тест) (см. Bronson et al., 1984) и тест с иммунными шариками (ИШ) (Bronson et al., 1982; Clarke et al., 1982, 1985). MAR-тест выполняют на свежих образцах спермы, а тест с иммунными шариками — на отмытых сперматозоидах. Результаты этих двух тестов не всегда согласуются друг с другом (MacMillan & Baker, 1987; Scarselli et al., 1987; Meinertz & Bronson, 1988; Hellstrom et al., 1989), однако результаты теста с иммунными шариками хорошо коррелируют с результатами иммобилизационного теста, который определяет антитела в сыворотке. Экспериментальные протоколы теста с иммунными шариками и MAR-теста варьируют, однако для обоих под микроскопом оценивают смесь сперматозоидов с шариками. Шарик прилипает к подвижным и неподвижным сперматозоидам, что позволяет выявлять на их поверхности антитела; рассчитывают процент подвижных сперматозоидов, покрытых шариками.
- Тесты на антиспермальные антитела в биологических жидкостях без сперматозоидов, то есть в семенной плазме, сыворотке крови и цервикальной слизи (непрямые тесты). В этих тестах разведенная, теплом инактивированная жидкость, в которой предполагают наличие АСАТ, инкубируется со сперматозоидами донора без антител, которые были отмыты от семенной плазмы. Все АСАТ в тестируемой жидкости будут специфически связываться с донорскими сперматозоидами, которые затем оценивают прямым тестом, как описано выше. Для получения надежных результатов важно выдерживать достаточное время для взаимодействия сперматозоидов и антител, время может быть увеличено до 10 мин для выявления смешанной агглютинации. Однако следует иметь в виду, что подвижность сперматозоидов снижается со временем, а тесты зависят от присутствия подвижных сперматозоидов.

Важно 1: Два теста на выявление АСАТ, описанные здесь, коммерчески доступны. Оба зависят от присутствия подвижных сперматозоидов. Если в эякуляте недостаточное число подвижных клеток, можно использовать непрямые тесты с семенной плазмой или сывороткой крови.

Важно 2: Цитотоксичные антитела, которые убивают все сперматозоиды или подавляют подвижность сперматозоидов, не могут быть обнаружены этими методами.

2.20.1 Тест на смешанную антиглобулиновую реакцию (MAR-тест)

Тест на смешанную антиглобулиновую реакцию (MAR-тест) является недорогим, быстрым и чувствительным скрининговым тестом (Rajah et al., 1992), который, однако, дает меньше информации, чем прямой тест с иммунными шариками (см. Раздел 2.20.2).

При выполнении MAR-теста антитело-«переносчик» (анти-IgG или анти-IgA) используют для обеспечения контакта шариков, покрытых антителами с неотмытыми сперматозоидами в сперме, несущими на своей поверхности IgA или IgG. Прямой MAR-тест на IgA и IgG выполняют путем перемешивания нативной необработанной спермы отдельно с латексными частицами (шариками) или обработанными эритроцитами, покрытыми человеческими IgG или IgA. Затем к суспензии добавляют моноспецифичный человеческий анти-IgG или анти-IgA. Формирование смешанных агглютинатов между частицами и подвижными сперматозоидами указывает на присутствие антител IgG или IgA на сперматозоидах. (Агглютинация между шариками сохраняется как положительный контроль для распознавания реакции «антитело-антиген»).

2.20.1.1 Процедура

1. Хорошо перемешайте образец спермы (см. Бокс 2.3).
2. Возьмите аликвоту эякулята 3,5 мкл и поместите ее на предметное стекло.
3. Возьмите еще одно предметное стекло с 3,5 мкл АСАТ-положительным эякулятом и одно стекло с 3,5 мкл АСАТ-отрицательным эякулятом как контроль в каждом прямом тесте. Этот эякулят следует брать у мужчин с и без АСАТ, соответственно, как показано в предыдущем описании MAR-теста. Альтернативно, АСАТ-положительные сперматозоиды можно получить путем инкубации в сыворотке, содержащей антитела (см. Раздел 2.20.3).
4. Добавьте 3,5 мкл латексных шариков, покрытых IgG к каждой капле теста и контроля и перемешайте путем взбалтывания (помешивания) в наконечнике пипетки.
5. Добавьте 3,5 мкл антисыворотки против человеческого IgG к каждой смеси спермы и латексных частиц и перемешайте в наконечнике пипетки.
6. Накройте суспензию покровным стеклом (22 × 22 мм) для достижения глубины препарата примерно 20 мкм (см. Бокс 2.4).
7. Удерживайте предметное стекло горизонтально в течение 3 мин при комнатной температуре во влажной камере (то есть на поверхности смоченной фильтровальной бумаги в закрытой чашке Петри) для предотвращения высыхания.
8. Оцените влажный препарат в фазово-контрастном микроскопе при увеличении ×200 или ×400 через 3 мин и еще раз — через 10 мин.
9. Повторите процедуру, используя IgA вместо шариков, покрытых IgG, и анти-IgA вместо антител анти-IgG.

2.20.1.2 Оценка

Если сперматозоиды имеют на своей поверхности антитела, латексные шарики будут прилипать к ним. Подвижные сперматозоиды сначала будут двигаться в окружении небольшого числа или даже группы прикрепленных частиц. Затем, в конце концов, агглютинаты станут на-

столько массивными, что движение сперматозоидов серьезно затруднится. Сперматозоиды, которые не покрыты антителами, будут плавать свободно между частицами.

Цель анализа — определить процент подвижных сперматозоидов, которые имеют прикрепленные шарики. Основная проблема возникает с неподвижными сперматозоидами, которые находятся близко к шарикам, но не прикреплены к ним. Являются ли шарики связанными, можно определить путем легкого сдвигания покровного стекла небольшим наконечником пипетки: движение шариков вместе с активными сперматозоидами укажет на положительное связывание.

1. Оцените только подвижные сперматозоиды и вычисляйте процент подвижных сперматозоидов, которые имеют две и более прикрепленных латексных частицы. Игнорируйте связывание с ними на кончике жгутика.
2. Подсчитайте не менее 200 подвижных сперматозоидов в каждом повторе, для достижения приемлемой ошибки подсчета (см. Бокс 2.5).
3. Рассчитайте процент подвижных сперматозоидов, которые содержат прикрепленные шарики на своей поверхности.
4. Запишите класс (IgA или IgG) и место связывания латексных частиц к сперматозоидам (головка, шейка, жгутик). Игнорируйте связывание на кончике жгутика.

Важно 1: Если 100% подвижных сперматозоидов окажутся покрытыми шариками в течение 3 мин, запишите это как результат теста; не анализируйте препарат после 10 мин.

Важно 2: Если менее 100% подвижных сперматозоидов окажутся покрытыми шариками через 3 мин, оцените препарат еще раз через 10 мин.

Важно 3: Если сперматозоиды теряют подвижность на 10 мин, запишите значение на 3 мин как результат теста.

2.20.1.3 Минимальное референсное значение

В настоящее время не существует значения для содержания сперматозоидов, покрытых антителами, при MAR-тесте спермы фертильных мужчин. В ожидании дополнительной информации данное руководство оставляет консенсусное значение 50% подвижных сперматозоидов, покрытых частицами, как пороговое значение.

Комментарий: Проникновение сперматозоидов в цервикальную слизь и оплодотворение *in vitro* значительно ухудшаются, когда более 50% подвижных сперматозоидов имеют антитела на своей поверхности (Abshagen et al., 1998). Частицы, связывающиеся с кончиком жгутика, не связаны с нарушением фертильности и могут присутствовать у фертильных мужчин (Chiu & Chamley, 2004).

2.20.2 Прямой тест с иммунными шариками

Этот анализ более затратный по сравнению с MAR-тестом эякулята фертильных мужчин. Однако он обеспечивает информацией о присутствии

антител на сперматозоидах, которые происходят из скрытых компонентов семенной плазмы.

При прямом анализе с иммунными шариками частицы, покрытые ковалентно связанными с кроличьими античеловеческими иммуноглобулинами против IgG или IgA, смешивают непосредственно с отмытыми сперматозоидами. Связывание частиц с античеловеческими IgG или IgA с подвижными сперматозоидами указывает на присутствие антител IgG или IgA на поверхности сперматозоидов.

2.20.2.1 Реагенты

1. Раствор Дульбекко (глюкозо-фосфат соляной буфер; Dulbecco's glucose-phosphate-buffered saline) (PBS) — альбумин бычьей сыворотки (BSA) или раствор Тироде — BSA: см. Приложение 4, Разделы A4.2 и A4.9.
2. Буфер I: добавьте 0.3 г фракции Коэна V BSA к 100 мл Dulbecco PBS или среды Тироде.
3. Буфер II: добавьте 5 г фракции Коэна V BSA к 100 мл Dulbecco PBS или среды Тироде.
4. Профильтруйте все растворы через фильтр с порами 0.45 мкм и нагрейте до температуры 25–35°C до их использования.

2.20.2.2 Приготовление иммунных шариков

1. Для каждого типа иммунных шариков (IgG, IgA) добавьте 0,2 мл основной суспензии шариков к 10 мл буфера I в отдельных центрифужных пробирках.
2. Центрифугируйте при 500 g или 600 g в течение 5–10 мин.
3. Отфильтруйте и отделите супернатант от отмытых иммунных шариков в осадке.
4. Аккуратно ресуспендируйте шарики в 0,2 мл буфера II.

2.20.2.3 Приготовление сперматозоидов

Количество спермы, необходимое для проведения анализа, определяют, исходя из концентрации и подвижности сперматозоидов, как показано в Табл. 2.7.

Таблица 2.7 Количество спермы, необходимое для проведения теста с иммунными шариками.

Концентрация сперматозоидов (10 ⁶ /мл)	Подвижность сперматозоидов (PR) (%)	Необходимый объем спермы (мл)
>50	—	0,2
21–50	>40	0,4
21–50	<40>10	0,8
10–20	>40	1,0
10–20	<40>10	2,0
<10>5	>10	>2,0

1. Хорошо перемешайте образец (см. Бокс 2.3).
2. Поместите необходимое количество спермы в центрифужную пробирку и доведите объем до 10 мл буфером 1.
3. Центрифугируйте при 500 g в течение 5–10 мин.
4. Отфильтруйте и отделите осадок отмытых сперматозоидов от супернатанта.
5. Аккуратно ресуспендируйте осадок сперматозоидов в 10 мл свежего буфера 1.
6. Центрифугируйте при 500 g в течение 5–10 мин.
7. Отфильтруйте и удалите супернатант.
8. Аккуратно ресуспендируйте осадок со сперматозоидами в 0,2 мл буфера 2.

Важно 1: Аликвоты более 1,0 мл требуют трехкратной отмытки.

Важно 2: Образцы с низкой подвижностью сперматозоидов (10% и менее) могут дать неправильный результат. В этом случае рассматривают непрямой тест с иммуношариками (см. Раздел 2.20.3).

2.20.2.4 Процедура

АСАТ-положительные и АСАТ-отрицательные сперматозоиды должны быть включены как контроль в каждый тест. Эякулят следует брать от мужчин с и без антиспермальных антител, соответственно, подтверждая результат с помощью прямого теста с иммунными шариками.

1. Поместите 5 мкл суспензии отмытых сперматозоидов на предметное стекло.
2. Подготовьте отдельно предметные стекла с 5 мкл АСАТ-положительными и 5 мкл АСАТ-отрицательными сперматозоидами.
3. Добавьте 5 мкл суспензии иммунных шариков с анти-IgG рядом с каждой каплей спермы.
4. Смешайте каждую каплю иммунных шариков с анти-IgG с каплей сперматозоидов с помощью наконечника пипетки.
5. Накройте препарат покровным стеклом 22 × 22 мм, обеспечив глубину примерно 20 мкм (см. Бокс 2.4).
6. Держите предметные стекла горизонтально в течение 3–10 мин при комнатной температуре во влажной камере (то есть на влажной фильтровальной бумаге в закрытой чашке Петри). Не следует ждать более 10 мин после приготовления препарата для его оценки, так как связывание иммунных шариков значительно снижается после инкубации (Gould et al., 1994).
7. Оцените препарат в фазово-контрастном микроскопе при увеличении ×200 или ×400.
8. Оценивайте только подвижные сперматозоиды, которые имеют два и более шарика на своей поверхности, как описано в Разделе 2.20.1.2. Игнорируйте связывание шариков на конце жгутика.

9. Интерпретируйте тест, как описано в Разделе 2.20.1.3.
10. Повторите процедуру с использованием суспензии иммунных шариков анти-IgA.

Важно: Для того чтобы убедиться, что все связывания произошли в течение 10 мин, аккуратно потрясите препарат на предметных стеклах.

2.20.2.5 Минимальное референсное значение

В настоящее время не существует значения для содержания сперматозоидов, покрытых антителами, при MAR-тесте спермы фертильных мужчин. В ожидании дополнительной информации данное руководство оставляет консенсусное значение 50% подвижных сперматозоидов, покрытых частицами, как пороговое значение.

Комментарий: Диагноз «иммунологическое бесплодие» ставят, когда более 50% подвижных сперматозоидов (прогрессивно подвижных и непрогрессивно подвижных) имеют на своей поверхности частицы (Barratt et al., 1992). Частицы, связывающиеся с кончиком жгутика, не связаны с нарушением фертильности и могут присутствовать у фертильных мужчин (Chiu & Chamley, 2004).

2.20.3 Непрямой тест с иммунными шариками

Непрямой тест с иммунными шариками используют для обнаружения антиспермальных антител в инактивированных теплом жидкостях без сперматозоидов (сыворотка, тестикулярная жидкость, семенная плазма или растворенная в бромелайне цервикальная слизь). С помощью сперматозоидов донора без антител на поверхности клеток выявляют антиспермальные антитела, присутствующие в тестикулярной жидкости, а затем проводят оценку, как в случае прямого теста с иммунными шариками.

2.20.3.1 Реагенты

См. Раздел 2.20.2.1 (реагенты для прямого теста с иммунными шариками). Если необходимо протестировать цервикальную слизь, приготовьте 10 МЕ/мл бромелайна, протеолитический энзим обширной специфичности (ЕС 3.4.22.32) (см. Бокс 2.2).

2.20.3.2 Приготовление иммунных шариков

См. Раздел 2.20.2.2.

2.20.3.3 Приготовление сперматозоидов донора

См. Раздел 2.20.2.3.

2.20.3.4 Приготовление жидкости для тестирования

1. При тестировании цервикальной слизи растворите ее 1+1 (1:2) в 10 МЕ/мл бромелайна, помешайте кончиком пипетки и инкубируйте при 37°С в течение 10 мин. После полного разжижения центрифугируйте при 2000 g в течение 10 мин. Анализируйте супернатант немедленно после центрифугирования или заморозьте его при -70°С.

2. Инактивируйте все компоненты в растворенной цервикальной слизи, сыворотке, семенной плазме или тестикулярной жидкости нагреванием до 56°С в течение 30–45 мин.
3. Разбавьте термо-инактивированный образец 1+4 (1:5) буфером II (то есть 10 мкл тестируемой жидкости с 40 мкл буфера II).
4. Включите известный положительный и отрицательный контроль, то есть сыворотку мужчин с антиспермальными антителами и без них, соответственно. Мужчины, подвергшиеся вазэктомии, могут рассматриваться как источник сыворотки с положительной реакцией (>50% подвижных сперматозоидов связываются с шариками, включая их связывание с концом жгутика).

2.20.3.5 Инкубация сперматозоидов донора с тестируемой жидкостью

1. Смешайте 50 мкл отмытой донорской спермы с 50 мкл разведенной 1+4 (1:5) тестируемой жидкости.
2. Инкубируйте при 37°С в течение 1 ч.
3. Центрифугируйте при 500 g в течение 5–10 мин.
4. Удалите супернатант.
5. Аккуратно ресуспендируйте осадок сперматозоидов в 10 мл свежего буфера 1.
6. Центрифугируйте снова при 500 g в течение 5–10 мин.
7. Отфильтруйте и удалите супернатант.
8. Повторите отмывку, этапы 5, 6 и 7.
9. Аккуратно ресуспендируйте осадок в 0,2 мл буфера 2.

2.20.3.6 Тест с иммунными шариками

1. Выполните тест с иммунными шариками, как описано в Разделе 2.20.2.4, с жидкостью, инкубированной со сперматозоидами донора.
2. Оцените и интерпретируйте результаты теста, как описано в Разделах 2.20.1.2. и 2.20.1.3.

ГЛАВА 3 Дополнительные тесты

Тесты, описанные в данной главе, обычно не рекомендуют для рутинного анализа эякулята, однако они могут иметь значение для диагностических и исследовательских целей.

3.1 Подсчет индексов множественных дефектов сперматозоидов

Сперматозоиды с патологической морфологией часто имеют множественные дефекты (головки, шейки или жгутика или комбинацию этих дефектов). Детальная оценка встречаемости морфологических аномалий может быть полезнее, чем простой расчет процента морфологически нормальных сперматозоидов, особенно при изучении степени влияния повреждающих факторов на сперматогенез человека (Jouannet et al., 1988; Auger et al., 2001). Подсчет морфологически нормальных сперматозоидов, а также клеток с аномалиями головки, шейки и жгутика дает среднее число аномалий на рассчитанное число сперматозоидов. Три индекса могут быть рассчитаны при детальном одновременном подсчете аномалий головки, шейки и жгутика:

- Индекс множественных аномалий (MAI, ИМА) (Jouannet et al., 1988);
- Индекс тератозооспермии (TZI, ИТЗ) (Menkveld & Kruger, 1996; Menkveld et al., 2001);
- Индекс деформированности сперматозоидов (SDI, ИДС) (Aziz et al., 1996, 2004).

Эти индексы коррелируют с фертильностью *in vivo* (MAI и TZI; ИМА и ИТЗ) (Jouannet et al., 1988; Menkveld et al., 2001; Slama et al., 2002) и *in vitro* (SDI; ИДС) (Aziz et al., 1996), и могут быть полезны при оценке повреждающих воздействий или патологических состояний (Auger et al., 2001; Aziz et al., 2004).

3.1.1 Подсчет индексов множественных дефектов сперматозоидов

Каждый аномальный сперматозоид оценивают по дефектам головки, шейки и жгутика, а также на присутствие чрезмерной резидуальной цитоплазматической капли (объем больше 1/3 размера головки сперматозоида). Могут быть использованы лабораторные счетчики с числом клавиш, адаптированным под тип рассчитываемого индекса. Если счетчика нет, может быть использован простой лист для подсчетов.

- Индекс ИМА (MAI) выражает среднее число дефектов на число дефектных сперматозоидов. Все аномалии головки, шейки и жгутика включаются в расчет. Морфологическим критерием, используемым для этого анализа, служит морфологический анализ, предложенный David et al. (1975) с модификациями Auger & Eustache (2000), и отличается от критериев, изложенных в настоящем руководстве (Разделы 2.15.1 и 2.15.2).
- Индекс ИТЗ (TZI) сходен с ИМА (MAI), но рассчитывают максимум четыре дефекта на аномальный сперматозоид: один на головку, шейку и

жгутик и один для оценки цитоплазматической капли, каким бы ни было реальное число аномалий на сперматозоид. Используют морфологические критерии, описанные в настоящем руководстве.

- Индекс ИДС (SDI) — число дефектов, деленное на общее число сперматозоидов (не только аномальных). Он объединяет несколько категорий аномалий головки, но только одну аномалию шейки и один дефект жгутика. Используют морфологические критерии, описанные в настоящем руководстве.

Таблица 3.1 Подсчет индексов множественных дефектов сперматозоидов

	ИМА (MAI)	ИТЗ (TZI)*	ИДС (SDI)
Максимальное значение		4,00	3,00
Общий знаменатель	число аномальных сперматозоидов	число аномальных сперматозоидов	число всех сперматозоидов
(A) Число подсчитанных сперматозоидов	200	200	200
Нормальных сперматозоидов (N)	46	46	46
Нормальных сперматозоидов (%)	23	23	23
(B) Число сперматозоидов с дефектами (200–46)	154	154	154
(1) Число дефектов головки (ИМА – MAI, ИДС – SDI) или число сперматозоидов с ≥1 дефектом головки (ИТЗ – TZI)	284	154	212
(2) Число дефектов шейки (ИМА – MAI) или число сперматозоидов с ≥1 дефектом шейки (ИТЗ – TZI, ИДС – SDI)	54	52	52
(3) Число дефектов жгутиков (ИМА – MAI) или число сперматозоидов с ≥1 дефектом жгутика (ИТЗ – TZI, ИДС – SDI)	54	46	46
(4) Число сперматозоидов с цитоплазматической каплей	14	14	14
(C) Сумма дефектов ИМА – MAI: (1) + (2) + (3) = (C)	392		
(D) Сумма дефектов (ИТЗ – TZI, ИДС – SDI): (1) + (2) + (3) + (4) = (D)		266	324
Вычисление индекса	C/B	D/B	D/A
Значение индекса	2,55	1,72	1,62

*Такое описание ИТЗ (-TZI) согласуется с описанием в оригинальной статье (Menkveld et al., 2001) и с Руководством Европейского общества репродуктивной медицины и эмбриологии (ESHRE) и Скандинавской ассоциации по андрологии (NAFA) (ESHRE/NAFA, 2002), которое дает значение в диапазоне от 1 до 4. Диапазон отличается от описания в предыдущей редакции Руководства по исследованию эякулята ВОЗ (WHO, 1999), в котором чрезмерную резидуальную цитоплазматическую каплю считали дефектом шейки, и в котором индекс ИТЗ (-TZI) изменялся в диапазоне от 1 до 3.

3.1.2 Примеры с решениями

Пример. При первом расчете с помощью 6-кнопочного счетчика из 200 сперматозоидов 42 были оценены как нормальные и 158 как аномальные. Из 158 аномальных сперматозоидов 140 имели дефект головки, 102 — дефект шейки, 30 — дефект жгутика и 44 были с увеличенной цитоплазматической каплей. При втором расчете: 36 оказались нормальными и 164 аномальными, из которых 122 имели дефект головки, 108 — дефект шейки, 22 — дефект жгутика и 36 имели цитоплазматическую каплю. Для определения ИТЗ (-TZI) поделили общее число вычисленных дефектов ($140+102+30+44+122+108+22+36 = 604$ аномалии) на число аномальных сперматозоидов ($158+164=322$), то есть $ИТЗ(-TZI) = 604/322 = 1,88$.

В табл. 3.2 показаны значения индексов ИМА (-MAI) и ИТЗ (-TZI), рассчитанные для пациентов клиник по преодолению бесплодия и мужчин, кто стал отцом в течение последних трех лет.

Таблица 3.2 Индекс аномалии сперматозоидов (ИДС — SDI), рассчитанный у мужчин в фертильных парах и парах с бесплодием

	Пары с бесплодием		Фертильные пары	
	(ИМА) – MAI ¹	(ИТЗ) – TZI ²	(ИМА) – MAI ³	(ИТЗ) – TZI ²
Среднее	1,94	1,81	1,58	1,51
Среднеквадратичное отклонение	0,37	0,3	0,2	0,2
Минимум	1,12	1,26	1,04	1,17
Максимум	3,9	2,64	2,38	2,07
Процентили				
5	1,44		1,27	
10	1,51	1,74	1,34	1,33
25	1,67		1,44	
50	1,88	1,81	1,58	1,54
75	2,14		1,72	
90	2,44		1,86	
95	2,65		1,94	
N	4930	103	994	107

¹ Неопубликованные данные J.Auger, Paris с использованием морфологической классификации David (David et al., 1975, с модификацией Auger & Eustache, 2000).

² Menkveld et al., 2001.

³ Jshrgensen et al., 2001 с использованием морфологической классификации David (David et al., 1975, с модификацией Auger & Eustache, 2000).

3.2 Панлейкоцит (CD45). Иммуноцитохимическое окрашивание (CD45)

Полиморфноядерные лейкоциты, потерявшие свои гранулы, и другие типы лейкоцитов, такие как лимфоциты, макрофаги или моноциты, которые не содержат пероксидазы, не могут быть обнаружены окрашива-

нием с помощью орто-толуидина на клеточную пероксидазу (см. Раздел 2.18.1), но их можно обнаружить иммуноцитохимически. Использование иммуноцитохимической реакции является дорогостоящим и более трудоемким методом по сравнению с оценкой пероксидазной активности гранулоцитов, но оно пригодно для идентификации лейкоцитов и половых клеток.

3.2.1 Принцип

Все типы (группы) лейкоцитов человека экспрессируют специфический антиген (CD45), который можно обнаружить подходящими моноклональными антителами. При изменении природы первичного антитела такая стандартная процедура может быть применена для того, чтобы обнаружить различные типы лейкоцитов, такие как макрофаги, моноциты, нейтрофилы, В-клетки или Т-клетки, когда они являются главным предметом исследования.

3.2.2 Реагенты

1. Фосфатно-буферная соль Дульбекко (Dulbессо, DPBS): см. Приложение 4, Раздел А4.2.
2. Трис буферная соль (TBS), pH 8,2; см. Приложение 4, Раздел А4.8.
3. Тетрамизоль-НСI (левамизоль) 1,0 моль/л: развести 2,4 г левамизоля в 10 мл дистиллированной воды.
4. Субстрат: к 9,7 мл TBS (pH 8,2) добавить 2 мг нафтола AS-MX фосфата, 0,2 мл диметилформаида и 0,1 мл 1,0 моль/л левамизоля. Непосредственно перед использованием добавить 10 мг быстрой красной соли TR и профильтровать (размер пор 0,45 мкм).
5. Фиксатор: чистый ацетон или смесь ацетон/метанол/формальдегид: к 95 мл ацетона добавить 95 мл чистого метанола и 10 мл 37% (v/v) формальдегида.
6. Первичные антитела: моноклональные мышинные антитела к общему антигену лейкоцитов, обозначенному как CD45.
7. Вторичные антитела: антимышинные кроличьи иммуноглобулины. Разведение зависит от титра антител и источников производства.
8. Щелочная фосфатаза — антищелочной фосфатный комплекс (АРААР).
9. Окрашивающая смесь гематоксилина Харриса (как контрастирующее окрашивание): см. Приложение 4, Раздел А4.10.

3.2.3 Процедура

3.2.3.1 Обработка эякулята

1. Тщательно перемешайте образец спермы (см. Бокс 2.3).
2. Смешайте аликвоту приблизительно 0,5 мл с пятью объемами DPBS.
3. Центрифугируйте при 500 g в течение 5 мин, удалите супернатант и суспендируйте осадок эякулята в пяти объемах DPBS.

4. Центрифугируйте при 500g в течение 5 мин.
5. Повторите процедуру еще раз и ресуспендируйте осадок в DPBS, доводя концентрацию приблизительно до 50×10^6 сперматозоидов на мл.

3.2.3.2 Подготовка мазков спермы

1. Приготовьте два мазка на чистых предметных стеклах (см. Раздел 2.13.2) из аликвот суспензии по 5 мкл и высушите их на воздухе.
2. Зафиксируйте суховоздушные препараты чистым ацетоном в течение 10 мин или смесью ацетон/этанол/формальдегид в течение 90 сек.
3. Отмойте дважды в TBS и высушите предметные стекла.
4. Затем препараты могут быть окрашены сразу же либо оберните их в алюминиевую фольгу и храните при температуре -70°C для последующего анализа.

3.2.3.3 Инкубирование с антителами

1. На каждом предметном стекле отметьте область зафиксированных клеток (круг около 1 см в диаметре) с помощью химического карандаша и покройте область слоем 10 мкл первичных моноклональных антител.
2. Инкубируйте препарат горизонтально в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере (например, в закрытой чашке Петри с намоченной фильтровальной бумагой), чтобы предотвратить высыхание.
3. Отмойте предметные стекла дважды в TBS и высушите.
4. Покройте ту же область 10 мкл вторичными антителами и инкубируйте в течение 30 мин во влажной камере при комнатной температуре.
5. Отмойте дважды в TBS и высушите препараты.
6. Добавьте 10 мкл APAAP на ту же область.
7. Инкубируйте в течение 1 ч во влажной камере при комнатной температуре.
8. Отмойте дважды в TBS и высушите препараты.
9. Инкубируйте с 10 мкл субстрата нафтол фосфата в течение 20 мин во влажной камере при комнатной температуре.

Важно: Для усиления продукта реакции можно повторить окрашивание вторичным антителом или APAAP с инкубированием в течение 15 мин для каждого реагента.

3.2.3.4 Контрастирующее окрашивание и заключение

1. Для появления цветной реакции красного цвета, отмойте препарат в TBS.
2. Проведите контрастирующее окрашивание в течение нескольких секунд в гематоксилине; отмойте в проточной воде и заключите в гистологическую водную среду (см. Разделы 2.14.2.4 и 2.14.2.5).

3.2.3.5 Оценка числа CD45-положительных клеток

1. Оцените окрашенную область на предметном стекле с использованием световой оптики при увеличении $\times 200$ или $\times 400$. CD45-положительные клетки (лейкоциты) окрашены красным (см. Рис. 3.1).
2. Рассчитайте отдельно число CD45-положительных клеток и не менее 200 сперматозоидов для того, чтобы получить приемлемо низкую статистическую ошибку (см. Бокс 2.7 и Табл. 2.2).
3. Проводите подсчет числа CD45-положительных клеток и сперматозоидов с помощью лабораторного счетчика.
4. Оцените второй препарат таким же образом (до достижения 200 сперматозоидов).
5. Вычислите сумму и различие между двумя подсчетами CD45-положительных клеток.
6. Определите приемлемость различий по Табл. 2.5. или Рис. A7.1; Приложение 7 (каждое показывает максимальное различие между двумя процентными значениями, которые, как ожидается, попадут в 95% доверительный интервал).
7. Если различие между процентными значениями приемлемо, запишите концентрацию (см. Раздел 3.2.3.6). Если различие слишком большое, пересчитайте препараты повторно (см. Бокс 2.10).
8. Запишите среднюю концентрацию CD45-положительных клеток по двум значимым показателям.
9. Рассчитайте общее число CD45-положительных клеток в эякуляте (см. Комментарий после Раздела 3.2.3.9).

3.2.3.6 Расчет концентрации CD45-положительных клеток в сперме

Концентрацию CD45-положительных клеток рассчитывают относительно числа сперматозоидов на препарате. Если N — число CD45-положительных клеток, подсчитанных в том же числе полей зрения, что и 400 сперматозоидов, а S — концентрация сперматозоидов ($10^6/\text{мл}$), тогда концентрацию (C) CD45-положительных клеток ($10^6/\text{мл}$) можно рассчитать по формуле: $C = S \times (N/400)$.

3.2.3.7 Чувствительность метода

Если число CD45-положительных клеток меньше, чем число сперматозоидов в образце (то есть < 400), статистическая ошибка будет превышать 5%. В этом случае запишите статистическую ошибку для подсчитанного числа клеток (см. Табл. 2.2).

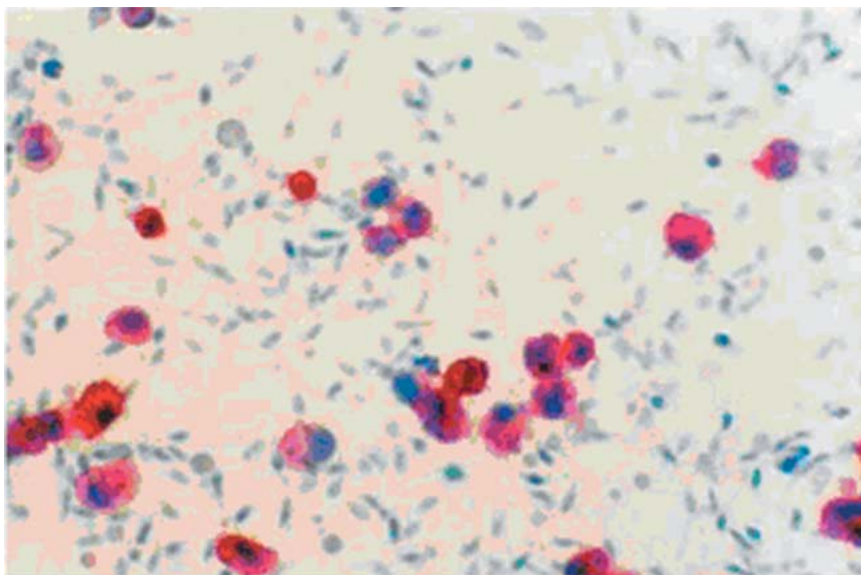
Если менее 25 CD45-положительных клеток подсчитано, запишите число наблюдаемых CD45-положительных клеток с комментарием: «Слишком мало клеток для точного определения концентрации».

3.2.3.8 Примеры с решениями

Пример 1. При первом подсчете обнаружено 20 CD45-положительных клеток на 200 сперматозоидов, при повторном — 40 CD45-положительных клеток на 200 сперматозоидов. Сумма значений (20+40) составля-

Рис.3.1. Лейкоциты в эякуляте

CD45-положительные клетки (лейкоциты) окрашены красным.



Микрофотография любезно предоставлена R. J. Aitken

ет 60, а различие (40–20) 20. Из Табл. 2.5 видим, что допустимое различие 15, таким образом, результаты признают непригодными и проводят новую оценку.

Пример 2. При первом подсчете обнаружено 25 CD45-положительных клеток на 200 сперматозоидов, при повторном — 35 CD45-положительных клеток на 200 сперматозоидов. Сумма значений (25+35) составляет 60 с различием (35–25) 10. Из Табл. 2.5 видим, что разница меньше приемлемой (15), таким образом, результат признан удовлетворительным. Для 60 CD45-положительных клеток на 400 сперматозоидов и при концентрации сперматозоидов $70 \times 10^6/\text{мл}$ концентрация CD45-положительных клеток составит $C = S \times (N/400)$ на мл = $70 \times 10^6 \times (60/400) = 10,5 \times 10^6$ клеток в мл или 10×10^6 клеток в мл (до двух значимых цифр). Так как менее 400 клеток было подсчитано, запишите статистическую ошибку для 60 клеток из Табл. 2.2 (приблизительно 13%).

3.2.3.9 Референсное значение

Не существует в настоящее время референсного значения для CD45-положительных клеток в эякуляте у фертильных мужчин. Пороговое значение, принятое как $1,0 \times 10^6$ клеток на мл для пероксидаза-позитивных клеток (см. Раздел 2.18.1.8), предполагает более высокую концентрацию общего числа лейкоцитов, так как не все лейкоциты являются пероксидаза-положительными гранулоцитами.

Комментарий: Общее число лейкоцитов (суммарное число лейкоцитов в эякуляте) может отражать тяжесть воспалительного заболевания (Wolff, 1995). Общее число CD45-положительных клеток в эякуляте рассчитывают умножением концентрации CD45-положительных клеток на общий объем эякулята.

3.3 Оценка взаимодействия сперматозоидов и цервикальной слизи

Цервикальная слизь способствует миграции сперматозоидов в ограниченный период менструального цикла (середина цикла), когда насыщенная эстрогенами цервикальная слизь благоприятна для пенетрации сперматозоидов. Период времени, в течение которого сперматозоиды могут пенетрировать цервикальную слизь, значительно варьирует у женщин и может изменяться у одной и той же пациентки от одного менструального цикла к другому.

Важно: См. Приложение 5 относительно особенностей сбора, хранения и оценки характеристик цервикальной слизи.

Комментарий: Когда мужчина не может получить эякулят для диагностики, посткоитальный тест (см. Раздел 3.3.1) может дать некоторую информацию о сперматозоидах партнера.

3.3.1 Тест *in vivo* (посткоитальный тест)

3.3.1.1 Цель

Цель посткоитального теста — определить число активных сперматозоидов в цервикальной слизи, а также оценить выживаемость сперматозоидов (Sobrero & MacLeod, 1962) и их поведение через несколько часов после полового акта (роль резервуара цервикальной слизи) (Moghissi, 1976). Такая информация может быть использована для оценки значимости положительного теста на антитела к сперматозоидам у обоих партнеров (мужчины и женщины).

3.3.1.2 Время проведения

Посткоитальный тест следует проводить как можно ближе к моменту овуляции (но до нее), определяемой на основании клинических критериев, например, обычная продолжительность менструального цикла, базальная температура, изменения цервикальной слизи, цитологическая картина влагалища, определение уровней эстрогенов или лютеинизирующего гормона в сыворотке или моче, ультразвуковое исследование яичников. Важно, чтобы каждая лаборатория проводила исследование цервикальной слизи через стандартный промежуток времени — между 9 и 14 часами после полового акта.

3.3.1.3 Рекомендуемые инструкции для пациентов при подготовке к посткоитальному тесту

При подготовке к посткоитальному тесту супружеской паре следует сообщить наиболее подходящий день для теста и дать следующие рекомендации.

1. Вы и ваш партнер должны воздержаться от половых сношений, мужчине следует избегать мастурбации в течение 2 дней до проведения теста.

2. Половое сношение должно произойти в ночь накануне даты теста.
3. Не следует пользоваться вагинальной смазкой во время полового сношения и подмываться после (вы можете принять душ после полового сношения, но не следует принимать ванну).
4. Женщине следует явиться в клинику для проведения теста на следующее утро.

3.3.1.4 Процедура

1. Введите гинекологическое зеркало без смазки во влагалище.
2. Туберкулиновым шприцем (без иглы), пипеткой или полиэтиленовой трубкой возьмите как можно больший образец выделений из заднего свода влагалища.
3. С помощью другого шприца или катетера аспирируйте как можно больше слизи из эндоцервикального канала.
4. Поместите образец слизи на предметное стекло, накройте покровным (22 × 22 мм) стеклом. Глубину препарата можно стандартизировать, используя покровное стекло с силиконовыми вставками или с помощью стекла, содержащего капли смеси воск-вазелин (см. бокс 3.1) диаметром 100 мкм (Drobnis et al., 1988).
5. Оцените препарат в фазово-контрастном микроскопе при увеличении ×400.

Важно: Для более надежных результатов важно, чтобы образец слизи был хорошего качества и не содержал контаминации клетками крови.

Бокс 3.1 Приготовление смеси воск-вазелин

Подготовьте смесь воск-вазелин заранее. Ее можно хранить при комнатной температуре до использования. Растопите воск (48–66°С точка плавления) в лабораторном стакане и смешайте его с вазелином (приблизительно одна часть воска на две части вазелина) с помощью стеклянной палочки. Доведите смесь до гомогенного состояния, медленно охладите. Пока смесь теплая, распределите ее по 3 мл или 5 мл шприцам (без иглы). Когда смесь застынет, наденьте на шприц иглу 18 G с тупым концом.

3.3.1.5 Образцы влагалищной слизи с низким содержанием сперматозоидов

Обычно сперматозоиды погибают во влагалище в течение 2 ч. Оцените влажный препарат с низким содержанием сперматозоидов (см. Раздел 2.4.2), чтобы убедиться, что сперма попала во влагалище.

3.3.1.6 Образец цервикальной слизи

Число сперматозоидов в нижней части цервикального канала зависит от времени, прошедшего с полового акта. Через 2–3 ч после коитуса происходит скопление сперматозоидов в нижней части цервикального канала.

Оцените число сперматозоидов в цервикальной слизи, опираясь традиционно на число проанализированных полей зрения при большом уве-

личении (см. Бокс 3.2). Концентрацию сперматозоидов в слизи следует выражать в числе сперматозоидов на мкл.

Бокс 3.2 Наблюдаемый объем на поле зрения при высоком увеличении на препарате цервикальной слизи глубиной 100 мкм

Объем цервикальной слизи в каждом микроскопе зависит от области поля зрения (πr^2 , где π приблизительно равно 3,142, а r — радиус поля зрения микроскопа) и глубины камеры (здесь 100 мкм). Диаметр поля зрения микроскопа можно измерить стационарным микрометром или можно оценить, поделив диаметр апертуры линз окуляра на увеличение линз объектива.

При объективе $\times 40$ и окуляре $\times 10$ с апертурой 20 мм поле зрения микроскопа имеет диаметр приблизительно 500 мкм (20 мм/40). В случае $r = 250$ мкм, $r^2 = 62\,500$ мкм², $\pi r^2 = 196\,375$ мкм², а объем равен 19 637 500 мкм³, или около 20 нл.

Таким образом, 10 сперматозоидов в поле зрения при увеличении $\times 400$ на препарате глубиной 100 мкм эквивалентны приблизительно 10 сперматозоидам на 20 нл цервикальной слизи или 500 сперматозоидов на мкл. Однако так как общее число подсчитанных клеток низкое, статистическая ошибка слишком высокая. Запишите статистическую ошибку для 10 клеток из Табл. 2.2. (приблизительно 32%).

Подвижность сперматозоидов в цервикальной слизи распределяют по следующим категориям:

- PR = прогрессивная подвижность;
- NP = непрогрессивная подвижность;
- IM = неподвижные сперматозоиды.

Самый важный индикатор нормальной функции цервикальной слизи — присутствие сперматозоидов с прогрессивной подвижностью.

3.3.1.7 Интерпретация результатов

- Тест признан отрицательным, если ни одного сперматозоида не обнаружено в цервикальной слизи.
- Присутствие хотя бы одного сперматозоида с прогрессивной подвижностью в эндоцервикальной слизи на 9–14 ч после полового акта говорит об отсутствии цервикального фактора бесплодия и аутоиммунной реакции на сперматозоиды у мужчины или женщины (Oei et al., 1995).
- Когда сперматозоиды с непрогрессивным движением совершают колебательные движения на месте, возможно присутствие антител к сперматозоидам либо в цервикальной слизи, либо на поверхности сперматозоидов.

Важно: Если первоначальный результат оказывается отрицательным или аномальным, посткоитальный тест следует повторить.

Комментарий 1: Если сперматозоиды в цервикальном канале не обнаружены, необходимо расспросить пару, действительно ли была эякуляция и сперма попала во влагалище.

Комментарий 2: Причиной отрицательного результата может быть неправильное время проведения анализа. Тесты, выполненные слишком рано или слишком поздно по менструальному циклу, могут дать отрицательные результаты и у фертильной женщины. У некоторых женщин тест может быть положительным только 1–2 дня в течение всего менструального цикла. Если время овуляции установить точно невозможно, следует повторить тест несколько раз в течение цикла или провести тесты *in vitro*.

Комментарий 3: Неоднократно полученный отрицательный результат посткоитального теста в течение нескольких циклов при условии оптимального времени его проведения может свидетельствовать о роли цервикального фактора как возможной причины бесплодия.

3.3.2 Тесты *in vitro*

Детальную оценку взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью можно провести с использованием пенетрационных тестов *in vitro*. Эти тесты обычно выполняют после отрицательного результата посткоитального теста и они являются более информативными, чем проведение перекрестного тестирования с использованием спермы донора и донорской цервикальной слизи как контроля. Они могут также быть использованы для оценки значимости положительного теста на антиспермальные антитела у супружеской пары.

- Когда целью проведения теста на взаимодействие сперматозоидов с цервикальной слизью является сравнение качества различных образцов слизи, следует применять один образец с нормозооспермией.
- Когда целью теста является оценка качества нескольких образцов спермы, следует использовать один и тот же образец цервикальной слизи хорошего качества, взятой в середине менструального цикла.

Важно: См. Приложение 5 для подробностей сбора, хранения и оценки характеристик цервикальной слизи.

Комментарий 1: Цервикальная слизь донора может быть получена в середине менструального цикла от женщин, которые планируют искусственную инсеминацию или пункцию яичников (аспирацию ооцитов) для ЭКО. Цервикальную слизь следует собирать до инсеминации в естественном цикле или в циклах, в которых овуляцию индуцируют приемом гонадотропинов.

Комментарий 2: Женщины, принимающие этинилэстрадиол в течение 7–10 дней, продуцируют эстрогенную слизь для тестирования (см. Приложение 5, Раздел A5.2.1).

Комментарий 3: Женщин, принимающих кломифен цитрат для индукции овуляции, не следует использовать как доноров цервикальной слизи, так как возможно отрицательное влияние антиэстрогенов на шейную слизь.

- Следует использовать цервикальную слизь женщины, полученную в середине менструального цикла.
- Тесты *in vitro* следует проводить в течение 1 ч после получения эякулята для того, чтобы предотвратить обезвоживание или колебания температуры, которые могут влиять на качество спермы.
- pH цервикальной жидкости (слизи) из эндоцервикального канала следует измерять pH бумагой в диапазоне 6,0–10,0 *in situ* или сразу же после получения жидкости. Если pH оценили *in situ*, следует проявлять особую осторожность, так как pH экзоцервикальной слизи всегда ниже, чем pH эндоцервикальной слизи. Работайте аккуратно, чтобы избежать контаминации выделениями влагалища, которые имеют низкий pH.
- Сперматозоиды восприимчивы к изменениям pH цервикальной слизи. Кислая слизь обездвигивает сперматозоиды, тогда как щелочная слизь может усиливать подвижность. Чрезмерная щелочность цервикальной слизи (pH>8,5) может неблагоприятно повлиять на выживаемость сперматозоидов. Оптимальное pH значение для миграции и выживания сперматозоидов в цервикальной слизи находится между 7,0 и 8,5, это диапазон pH значений нормальной цервикальной слизи в середине менструального цикла. Если pH между 6,0 и 7,0 не влияет на пенетрацию сперматозоидов, то подвижность часто нарушена при pH ниже 6,5, а тесты на взаимодействие сперматозоидов с цервикальной слизью часто невыполнимы, если pH ниже 7,0.

Важно: Вспомогательные гели, такие как цервикальная слизь быков или синтетические гели, не могут рассматриваться эквивалентами цервикальной слизи человека для проведения тестов на взаимодействие сперматозоидов с цервикальной слизью. Однако использование этих материалов дает информацию о подвижности сперматозоидов внутри вязкой среды (Neuwinger et al., 1991; Ivic et al., 2002).

3.3.3 Упрощенный *in vitro* тест на предметном стекле

3.3.3.1 Процедура

1. Поместите каплю цервикальной слизи на предметное стекло и накройте ее покровным стеклом (22 × 22 мм). Глубина такого препарата может быть стандартизована при использовании покровного стекла с силиконовыми каплями или смеси воск-вазелин (см. Бокс 3.1), содержащей стеклянные шарики диаметром 100 мкм (Drobnis et al., 1988).
2. Поместите каплю эякулята на границе каждого покровного стекла так, чтобы сперма затекла под стекло под действием капиллярных сил. В этом случае формируются светлые промежутки между цервикальной слизью и спермой.
3. Удерживайте предметное стекло горизонтально в течение 30 мин при 37°С во влажной камере (то есть на влажной фильтровальной бумаге в закрытой чашке Петри) для предотвращения высыхания.
4. Оцените поверхность приготовленного препарата в фазово-контрастном микроскопе при увеличении ×400.

3.3.3.2 Наблюдения

Наблюдайте за появлением следующих признаков.

1. В течение нескольких минут формируются пальцевидные выступы («фаланги») семенной жидкости, проникающие в цервикальную слизь. Это физиологическая особенность жидкостей, и она может происходить даже при образцах с азооспермией (Perloff & Steinberger, 1963; Moghissi et al., 1964).
2. Большинство сперматозоидов пенетрируют фаланговый канал до входа в слизь. Во многих случаях один сперматозоид увлекает за собой в цервикальную слизь группу (тяж) сперматозоидов.
3. Попав в цервикальную слизь, сперматозоиды рассеиваются и двигаются хаотично. Некоторые возвращаются в семенную плазму, но большая их часть продолжает мигрировать в глубь цервикальной слизи, пока не встретит препятствие из клеточного дебриса или лейкоцитов.
4. Сперматозоиды проникают в цервикальную слизь на глубину 500 мкм (то есть около 10-кратной длины сперматозоидов) и больше.
5. Сперматозоиды подвижны (отметьте приблизительный процент подвижных сперматозоидов, и является ли их движение прогрессивным).

3.3.3.3 Интерпретация результатов

Оценка упрощенного 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. Тем не менее, из теста можно сделать следующие полезные наблюдения.

1. Нормальный результат: сперматозоиды пенетрируют в слизь и более 90% из них имеют отчетливую прогрессивную подвижность. В этом случае предполагают, что не существует никаких проблем при взаимодействии сперматозоидов с цервикальной слизью.
2. Плохой результат: сперматозоиды пенетрируют в слизь, но большинство из них не продвигаются далее, чем на 500 мкм (то есть около 10-кратной длины сперматозоида) от поверхности соприкосновения эякулята со слизью. Предполагают, что существует проблема при взаимодействии эякулята с цервикальной слизью.
3. Аномальный результат: либо (1) сперматозоиды пенетрируют в слизь, но быстро становятся неподвижными или их движения становятся «колебательными», либо (2) сперматозоиды не пенетрируют в слизь. Фаланги могут формироваться или нет, но сперматозоиды скапливаются вдоль границы их соприкосновения с цервикальной слизью. В таких случаях предполагают присутствие антиспермальных антител в цервикальной слизи или на поверхности сперматозоидов.

Комментарий: Когда получен аномальный результат при использовании образцов спермы и цервикальной слизи супружеской пары, возможно использование перекрестного теста с донорской спермой или донорской цервикальной слизью для того, чтобы определить, что приводит к аномальному результату их взаимодействия: сперма или цервикальная слизь.

3.3.4 Тест с капиллярными трубочками

Тест с капиллярными трубочками был разработан Кремер (1965), в настоящее время предложен ряд его модификаций. Тест оценивает способность сперматозоидов пенетрировать тяж цервикальной слизи в капилляре. Процедура, рекомендованная в настоящем руководстве, основана на оригинальном тесте.

3.3.4.1 Оборудование

Различные типы капиллярных трубочек могут быть использованы, но рекомендованы плоские капиллярные трубочки длиной 5 см с внешним диаметром 0,3 мм.

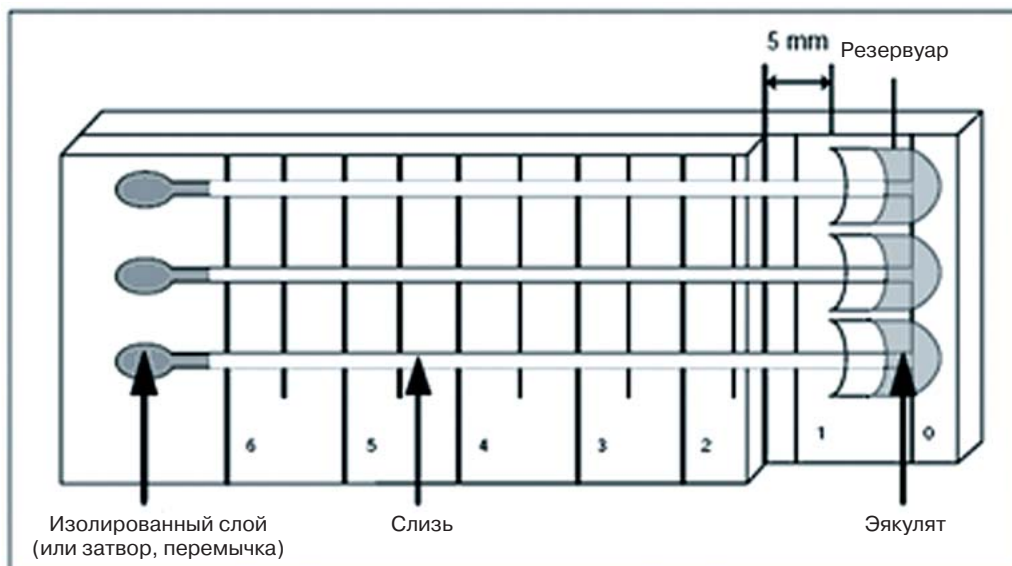
Измеритель Кремера пенетрационных возможностей спермы (Рис. 3.2) может быть сконструирован в лаборатории следующим образом.

1. Прикрепите на предметное стекло три небольших отрезка пластиковой трубки (радиус примерно 3,5 мм).
2. Прикрепите второе предметное стекло на первое. Второе стекло должно быть на 1,5 см короче и размещаться на расстоянии 5 мм от трубочек. Такая конструкция предотвращает распространение спермы между капиллярной трубкой и предметным стеклом.
3. Прикрепите сантиметровую шкалу к предметному стеклу.

3.3.4.2 Процедура

1. Поместите в каждый резервуар примерно 100 мкл разжиженного эякулята, полученного не позднее 1 ч после семяизвержения.
2. Аспирируйте цервикальную слизь в каждую капиллярную трубку, избегая формирования воздушных пузырьков.
3. Запечатайте конец каждой трубки уплотнителем, специальной глиной или аналогичным материалом. Следует использовать достаточное количество уплотнителя, чтобы столб цервикальной слизи слегка выходил за открытый конец трубки.
4. Поместите открытый конец капиллярной трубки на предметное стекло так, чтобы он погрузился примерно на 0,5 см в контейнер со спермой.
5. Храните устройство горизонтально в течение 2 ч при 37°С во влажной камере (например, на влажной фильтровальной бумаге в закрытой чашке Петри) для предотвращения высыхания спермы и цервикальной слизи.
6. Оцените капиллярную трубку в фазово-контрастном микроскопе при увеличении $\times 100$, как описано в Разделе 3.3.4.3.

Рис. 3.2. Измеритель Кремера пенетрационных возможностей спермы



7. Верните устройство в инкубатор с 37°С и проверьте капиллярные трубки снова через 24 ч на присутствие прогрессивно-подвижных сперматозоидов.

3.3.4.3 Наблюдения

После 2 ч оцените расстояние миграции, плотность пенетрации, состояние миграции и присутствие сперматозоидов с прогрессивным движением.

1. Расстояние миграции: запишите расстояние от конца капиллярной трубки в резервуаре со спермой до ближайшего сперматозоида в капилляре.
2. Плотность пенетрации: измерьте его на расстоянии 1 см и 4,5 см от конца капиллярной трубки в резервуаре со спермой. В каждой точке запишите среднее число сперматозоидов на поле зрения (увеличение $\times 100$).

Среднее значение, полученное при оценке пяти полей зрения при низком разрешении, выразите как ранг плотности пенетрации, как описано в Табл. 3.3. Для классификации теста наибольшую плотность пенетрации сперматозоидов запишите либо при 1 см, либо при 4,5 см.

Таблица 3.3. Определение рангов плотности пенетрации сперматозоидов

Среднее число сперматозоидов на поле зрения при низком увеличении	Ранг
0	1
0–5	2
6–10	3
11–20	4
21–50	5
51–100	6
>100	7

3. Сокращение миграции: рассчитывают как снижение плотности пенетрации при 4,5 см по сравнению с 1 см. Выражают в виде разницы в рангах.

Пример 1. Плотность пенетрации при 1 см равна 51–100 на поле зрения, а при 4,5 см — 6–10. Значение сокращения миграции равно 3 (от ранга 6 до ранга 3) (Табл. 3.3).

Пример 2. Плотность пенетрации при 1 см равна 21–50, а при 4,5 см 51–100. Сокращение миграции в данном случае равно нулю, так как фактически плотность пенетрации увеличивается (от ранга 5 до ранга 6) (Табл. 3.3).

4. Сперматозоиды с прогрессивным движением: определить присутствие в цервикальной слизи сперматозоидов с прогрессивной подвижностью через 2 ч и 24 ч.

3.3.4.4 Интерпретация результатов

Результат классифицируют как отрицательный, плохой или хороший, согласно Табл. 3.4.

Таблица 3.4 Классификация результатов теста с капиллярными трубочками

Расстояние миграции (см)		Наибольшая плотность пенетрации (число сперматозоидов на LPF при 1 или 4.5 см)		Сокращение пенетрации от 1 до 4,5 см (снижение в рангах)		Продолжительность прогрессивного движения в слизи (ч)	Классификация
1		0		—		—	Отрицательный
<3	или	<10	или	>3	или	2	Плохо
4.5	и	>50	и	<3	и	>24	Хорошо
Все остальные комбинации результатов теста							Положительный

3.4 Биохимический анализ функции придаточных половых желез

Плохое качество эякулята может быть результатом продукции аномальных сперматозоидов в яичках, либо посттестикулярного повреждения сперматозоидов в эпидидимисе, а также аномальной секреторной способности придаточных половых желез. Существуют различные биохимические маркеры функции придаточных желез, например лимонная кислота, цинк, γ -глутамилтранспептидаза и кислая фосфатаза для предстательной железы; фруктоза и простагландины для семенных пузырьков; свободный L-карнитин, глицерофосфохолин (glycerophosphocholine, GPC) и нейтральная α -глюкозидаза для эпидидимиса.

Иногда инфекционные заболевания могут вызывать снижение секреции этих маркеров, однако, несмотря на это, общая концентрация маркеров в эякуляте должна оставаться в пределах нормы. Инфекции также могут приводить к необратимым нарушениям секреторного эпителия, в этом

случае даже после проведенного лечения секреция остается на низком уровне (Cooper et al., 1990a; von der Kammer et al., 1991).

- Секреторная способность предстательной железы. Содержание цинка, лимонной кислоты (Müllering & Gruber, 1966) или кислой фосфатазы (Heite & Wetterauer, 1979) в эякуляте служат достоверными показателями секреторной функции предстательной железы, отмечена хорошая корреляция между уровнями этих маркеров. Спектрофотометрический анализ содержания цинка описан в Разделе 3.4.1.
- Секреторная способность семенных пузырьков. Уровень фруктозы в эякуляте отражает секреторную функцию семенных пузырьков. Спектрофотометрический метод ее оценки описан в Разделе 3.4.2.
- Секреторная способность эпидидимиса. L-Карнитин, глицерофосфохолин и нейтральную α -глюкозидазу используют в клинической практике как маркеры функции эпидидимиса. Нейтральная α -глюкозидаза, как показано, является наиболее специфичной и чувствительной для оценки патологии эпидидимиса, чем L-карнитин и глицерофосфохолин (Cooper et al., 1990a). В семенной плазме присутствует два изомера α -глюкозидазы: большой, нейтральный, который образуется исключительно в эпидидимисе, и маленький, кислый изомер, который образуется главным образом в предстательной железе. Простой спектрофотометрический анализ определения нейтральной α -глюкозидазы описан в Разделе 3.4.3.

Комментарий: Общее содержание всех секретов любой половой железы в эякуляте отражает суммарную секреторную функцию этой железы (Eliasson, 1975). Оно может быть рассчитано умножением концентрации маркеров половых желез на объем всего эякулята.

3.4.1 Определение цинка в семенной жидкости

3.4.1.1 Основа

Набор для измерения сывороточного уровня цинка с помощью спектрометрического анализа коммерчески доступен и может быть адаптирован для спермы. Метод, описанный ниже, основан на методе Johnsen & Eliasson (1987), модифицированном для использования с 96-луночными чашками с чувствительностью 4 мкмоль/л (Cooper et al., 1991). Объемы эякулята и реагентов могут быть пропорционально изменены для спектрофотометров с использованием кювет объемом 3 мл или 1 мл. Необходимая корректировка должна быть выполнена при расчете результата.

3.4.1.2 Принцип

Смесь 2-(5-бromo-2-пиридилазо)-5-(N-пропил-N-сульфопропиламино)фенол (5-Br-PAPS) [2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfopropylaminophenol)] связывается с цинком, меняя цвет.

$5\text{-Br-PAPS} + \text{Zn}^{2+} \rightarrow 5\text{-Br-PAPS-Zn}$ комплекс, который поглощает свет с длиной волны 560 нм.

3.4.1.3 Реагенты

1. Коммерчески доступны наборы для оценки содержания цинка в сыворотке. Используйте только цветовой реагент А (2 × 60 мл флаконы) и цветовой реагент В (1 × 30 мл флакон).
2. Стандартный раствор цинка (100 мкмоль/л): растворите 0,144 г сульфата цинка $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ в 50 мл дистиллированной воды и разведите полученный раствор 100-кратно с помощью добавления 1 мл его к 99 мл дистиллированной воды. Храните раствор замороженным при температуре $-20^\circ C$.
3. Стандартная кривая: разбавьте 100 мкмоль/л стандартного раствора цинка, приготовленного согласно пункта 2, дистиллированной водой до получения дополнительных концентраций 80, 60, 40, 20 и 10 мкмоль/л.
4. Цветовой реагент: смешайте 4 части цветового реагента А с 1 частью цветового реагента В (около 25 мл необходимо для одного 96-луночного планшета). Такой хромогенный раствор стабилен в течение 2 дней при комнатной температуре или в течение одной недели при температуре $4^\circ C$.
5. Заморозьте семенную плазму для проведения внутреннего контроля качества (см. Раздел 3.4.1.4, этап 1).

3.4.1.4 Процедура

1. Центрифугируйте образец спермы, оставшийся после проведения семиологического анализа, в течение 10 мин при 1000 g. Отделите осадок и храните семенную плазму (без сперматозоидов) при температуре $-20^\circ C$ до проведения анализа. Семенную плазму без сперматозоидов можно объединить с другими образцами плазмы эякулята для обеспечения стандартных значений для внутреннего контроля качества в дальнейших исследованиях.
2. Разморозьте семенную плазму и хорошо перемешайте ее с помощью вортекса. Также разморозьте и перемешайте аликвоту семенной плазмы для проведения внутреннего контроля качества.
3. Подготовьте по два раствора каждого образца семенной плазмы: к 300 мкл дистиллированной воды в каждую из двух 1,5 мл пробирок добавьте 5 мкл семенной плазмы (пипеткой с положительным замещением) и перемешайте с помощью вортекса в течение 5 сек.
4. Добавьте повторно 40 мкл аликвоты разбавленной семенной плазмы из пункта 3 в 96-луночный планшет. Включите пустые лунки (40 мкл дистиллированной воды) и две повторные лунки по 40 мкл для каждого стандартного разведения.
5. Добавьте 200 мкл цветового реагента в каждую лунку и размешивайте в течение 5 мин на шейкере для 96-луночного планшета.
6. Производите измерения при длине волны 560 нм, используя пустой планшет с водой для установки нуля.

3.4.1.5 Оценка

1. Оцените концентрацию цинка в образце по стандартной кривой (моль/л), сравнивая значения оптической плотности.
2. Отбросьте результаты, которые лежат выше стандартных, и переоцените образцы при больших разведениях (используйте для разведения дистиллированную воду).
3. Умножьте полученные значения на степень разведения 61 (5 мкл семенной плазмы растворяли в 300 мкл воды) для получения концентрации цинка (ммоль/л) в неразведенной семенной плазме.
4. Повторные значения должны отличаться не более чем на 10%, то есть $(\text{разница между оцененными значениями/среднее}) \times 100 \leq 10\%$. Если это условие не выполняется, повторите анализ на двух новых аликвотах семенной плазмы.
5. Умножьте концентрацию цинка на весь объем эякулята (мл) для получения общего содержания цинка в сперме.

3.4.1.6 Минимальное референсное значение

Минимальным референсным значением для цинка является 2,4 мкмоль на эякулят (Cooper et al., 1991 и неопубликованные данные T. G. Cooper).

3.4.2 Оценка фруктозы в семенной плазме

3.4.2.1 Основа

Метод, описанный ниже, предложен Karvonen & Malm (1955), модифицирован для использования с 96-луночными планшетами с чувствительностью 74 мкмоль/л (Cooper et al., 1990a). Объемы спермы и реагентов могут быть пропорционально установлены для спектрофотометров, использующих кюветы по 3 мл или по 1 мл. Соответствующая корректировка должна быть проведена при расчете результатов.

3.4.2.2 Принцип

При действии нагревания и низкого pH фруктоза образует окрашенные комплексы с индолом.

Фруктоза+индол $\xrightarrow{\text{Нагревание+кислота}}$ Комплекс, поглощающий свет при длине волны 470 нм.

3.4.2.3 Реагенты

Набор для определения фруктозы в семенной плазме коммерчески доступен.

Альтернативно, подготовьте следующие реагенты.

1. Депротенинизированный агент 1 (63 мкмоль/л ZnSO_4): растворите 1,8 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в 100 мл дистиллированной воды.
2. Депротенинизированный агент 2 (1 моль/л NaOH): растворите 0,4 г NaOH в 100 мл дистиллированной воды.
3. Цветовой реагент (индол 2 мкмоль/л в консерванте бензоата 16 мкмоль/л): растворите 200 мг бензойной кислоты в 90 мл дистилли-

рованной воды, помешивая раствор на водяной бане при температуре 60°С. Растворите в нем 25 мг индола и доведите полученный раствор до 100 мл с помощью дистиллированной воды. Профильтруйте (размер пор 0,45 мкм) и храните при температуре 4°С.

4. Стандартный раствор фруктозы (2,24 ммоль/л): растворите 40 мг D-фруктозы в 100 мл дистиллированной воды. Храните при температуре 4°С или заморозьте аликвоты.
5. Стандартная кривая: растворите 2,24 ммоль/л стандартного раствора в дистиллированной воде для получения четырех стандартных концентраций 1, 12, 0,56, 0,28 и 0,14 ммоль/л.
6. Заморозьте семенную плазму для проведения внутреннего контроля качества (см. Раздел 3.4.2.4, этап 1).

3.4.2.4 Процедура

1. Центрифугируйте образец спермы, оставшийся после семиологического анализа, в течение 10 мин при 1000 g. Удалите осадок и храните свободную от сперматозоидов семенную жидкость при температуре -20°С до анализа. Такую семенную плазму можно объединить с другими образцами для проведения внутреннего контроля качества при дальнейших исследованиях.
2. После оттаивания семенную плазму хорошо перемешайте с помощью вортекса. После оттаивания также перемешайте аликвоту семенной плазмы для внутреннего контроля качества.
3. Подготовьте разведения для каждого образца семенной плазмы: к 50 мкл дистиллированной воды в каждой 1,5 мл пробирке добавьте 5 мкл семенной плазмы (с помощью пипетки с положительным замещением) и перемешайте.
4. Депротеинизация: к 55 мкл разбавленного образца добавьте 12,5 мкл 63 мкмоль/л $ZnSO_4$ и 12,5 мкл 0,1 моль/л NaOH и перемешайте. Дайте отстояться в течение 15 мин при комнатной температуре, затем центрифугируйте в течение 5 мин при 8000 g.
5. Перенесите 50 мкл супернатанта из каждого образца в тестируемую пробирку. Включите пустые лунки (50 мкл дистиллированной воды) и две повторные лунки по 50 мкл для каждого стандартного разведения.
6. Добавьте 50 мкл реагента индола в каждую пробирку и перемешайте.
7. Добавьте 0,5 мл концентрированной (32% v/v) соляной кислоты (HCl) в каждый образец, накройте уплотнителем, герметизируйте с помощью адгезивной лабораторной пленки и аккуратно перемешайте в вытяжном шкафу.
8. Нагревайте в течение 20 мин на водяной бане при температуре 50°С. Перемешайте и охладите в емкости со льдом в течение 15 мин.
9. Аккуратно перенесите 250 мкл аликвоту с помощью пипетки с положительным замещением в 96-луночную чашку в вытяжном шкафу.
10. Запечатайте 96-луночную чашку с помощью прозрачной адгезивной лабораторной пленки для защиты спектрофотометра от кислоты.

11. Изучите чашку при длине волны 470 нм с использованием водяной чашки для установки нуля.

3.4.2.5 Вычисление

1. Оцените концентрацию фруктозы в образце по стандартной кривой (ммоль/л), сравнивая значения оптической плотности.
2. Отбросьте результаты, если они лежат выше стандартных значений и проведите повторный анализ образцов при большем разведении (используйте дистиллированную воду для разведения).
3. Умножьте результат для каждого образца на степень разведения 16 (5 мкл семенной плазмы растворяли в 75 мкл воды с депротеинизирующими агентами) для получения концентрации фруктозы (ммоль/л) в неразведенной семенной плазме.
4. Повторные значения должны отличаться не более чем на 10%, то есть $(\text{разница между оцененными значениями/среднее}) \times 100 \leq 10\%$. Если это условие не выполняется, повторите анализ на двух новых аликвотах семенной плазмы.
5. Умножьте значение концентрации фруктозы на общий объем эякулята (мл) для получения суммарного содержания (мкмоль) фруктозы в сперме.

3.4.2.6 Минимальное референсное значение

Минимальным референсным значением уровня фруктозы служит 13 мкмоль на эякулят (Cooper et al., 1991 и неопубликованные данные T. G.Cooper).

Комментарий: Низкий уровень фруктозы в эякуляте характерен для пациентов с обструкцией семявыносящей системы, билатеральным наследственным отсутствием *vas deferens* (de la Taille et al., 1998; Daudin et al., 2000; von Eckardstein et al., 2000), с частичной ретроградной эякуляцией и андрогенным дефицитом.

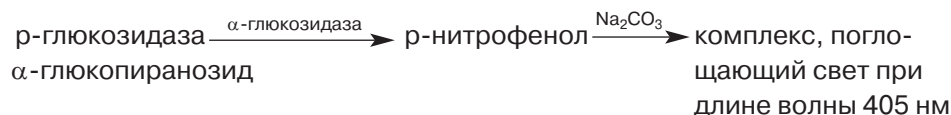
3.4.3 Измерение нейтральной α -глюкозидазы в семенной плазме

3.4.3.1 Основа

Семенная плазма содержит как нейтральный изомер α -глюкозидазы, который продуцируется в эпидидимисе, так и кислый, выделяемый простатой. Последний может быть селективно ингибирован додецилсульфатом натрия (SDS) (Paquin et al., 1984) для того, чтобы позволить измерить нейтральную α -глюкозидазу, содержание которой отражает функцию эпидидимиса. Благодаря разрушению субстрата, не содержащего глюкозидазы, с помощью ингибитора кастаноспермина, техника определения является более чувствительной. При методе, описанном ниже, используют 96-луночные планшеты с чувствительностью 1,9 мЕд/мл (Cooper et al., 1990b). Объемы спермы и реагентов могут быть пропорционально изменены для спектрофотометров, использующих кюветы по 3 мл или 1 мл. Соответствующая корректировка должна быть проведена при расчете результатов.

3.4.3.2 Принцип

Глюкозидаза превращает синтетический субстрат глюкопиранозид (glucopyranoside) в *p*-нитрофенол (*p*-nitrophenol), который при добавлении карбоната натрия вызывает свечение желтым.



3.4.3.3 Реагенты

Набор для оценки в эякуляте нейтральной α -глюкозидазы из эпидидимиса коммерчески доступен. Рекомендовано использовать только те наборы, которые содержат SDS и кастаноспермин (castanospermine), для анализа этого фермента в сперме.

Альтернативно, подготовьте следующие реагенты.

1. Буфер 1 (0.2 моль/л фосфата, pH 6.8): растворите 4.56 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ в 100 мл дистиллированной воды. Растворите 2.72 г KH_2PO_4 в отдельной аликвоте 100 мл дистиллированной воды. Смешайте приблизительно равные объемы каждого раствора до достижения pH, равного 6.8.
2. Буфер 2: растворите 1 г SDS в 100 мл буфера 1. SDS будет выпадать в осадок при хранении при 4° С, при этом снова растворяться при аккуратном нагревании.
3. Цветовой реагент 1 (для прекращения реакции, 0.1 моль/л карбоната натрия): растворите 6.20 г $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ в 500 мл воды.
4. Цветовой реагент 2: растворите 0.1 г SDS в 100 мл цветового реагента 1.
5. Субстрат *p*-нитрофенола глюкопиранозида (PNPG) (5 мг/мл): растворите 0.1 г PNPG в 20 мл буфера 2 и нагрейте раствор на плите до 50° С, помешивая в течение примерно 10 мин. Небольшое количество кристаллов могут остаться нерастворенными. Раствор следует держать при 37°С во время использования. Готовьте свежий раствор для каждого анализа.
6. Ингибитор глюкозидазы для лунок со спермой (кастаноспермин — castanospermine, 10 ммоль/л): растворите 18.9 мг кастаноспермина в 10 мл дистиллированной воды. Разбавьте его 10-кратно дистиллированной водой до получения рабочего раствора 1 ммоль/л. Заморозьте приблизительно 1-мл аликвоты при температуре –20° С.
7. Стандартная кривая для продукта *p*-нитрофенола (PNP) (5 ммоль/л): растворите 69.5 мг PNP в 100 мл дистиллированной воды, нагревая раствор, если это необходимо. Храните при температуре 4° С в темной, покрытой алюминиевой фольгой, таре из темного (коричневого) стекла. Готовьте свежий стандартный раствор каждые три месяца.
8. Приготовление стандартной кривой (в течение последнего часа инкубации): поместите 400 мкл 5 ммоль/л базового раствора PNP в 10-мл объемистую колбу и добавьте 10 мл цветового реагента 2 (200 ммоль/л). Разведите 200 мкмоль/л стандартного раствора цветовым реагентом 2 до получения четырех дополнительных растворов 160, 120, 80 и 40 мкмоль/л PNP.

9. Заморозьте образцы семенной плазмы для проведения внутреннего контроля качества (см. Раздел 3.4.3.4, этап 1).

3.4.3.4 Процедура

1. Центрифугируйте образец спермы, оставшийся после анализа, в течение 10 мин при 1000 g. Удалите осадок и храните семенную плазму без сперматозоидов при температуре -20°C до проведения анализа. Семенную плазму без сперматозоидов можно объединить с другими образцами для проведения внутреннего контроля качества.
2. Разморозьте семенную плазму, освобожденную от сперматозоидов, и хорошо ее перемешайте с помощью вортекса. Также разморозьте и перемешайте аликвоту семенной плазмы для проведения внутреннего контроля качества.
3. Поместите 15 мкл аликвоты образца семенной плазмы в каждую из двух 1,5 мл пробирок с помощью пипетки с положительным замещением. Включите пустые лунки (15 мкл воды) и учетверите образцы по 15 мкл для внутреннего контроля качества.
4. К двум образцам для внутреннего контроля качества добавьте 8 мкл 1 ммоль/л кастаноспермина для обеспечения нулевого значения семенной плазмы.
5. Добавьте 100 мкл раствора субстрата PNPG при температуре 37°C в каждую пробирку.
6. С помощью вортекса перемешайте каждую пробирку и инкубируйте при температуре 37°C в течение 2 ч (критический момент — поддержание температуры и контроль времени)
7. Прекратите инкубирование после 2 ч добавлением 1 мл цветового реагента 1 и перемешайте.
8. Перенесите 250 мкл образцов и стандартных разведений в 96-луночную чашку.
9. Оцените результаты в 96-луночной чашке при длине волны 405 нм в течение 60 мин с использованием водной чашки для установки нуля.

3.4.3.5 Вычисление

1. Оцените концентрацию PNP образца из стандартной кривой (мкмоль/л), сравнивая значения оптической плотности.
2. Отбросьте результат, если он лежит выше стандартного значения и повторите анализ образцов после разведения (используйте буфер 1 для разведения).
3. Умножьте на корректирующий фактор (0.6194; см. Важно) для получения активности нейтральной глюкозидазы в неразведенной семенной плазме (МЕ/л).
4. Вычтите активность (МЕ/л) кастаноспермина в семенной плазме из каждого образца для получения корректной активности (связанной с глюкозидазой).

5. Повторные значения должны отличаться не более чем на 10%, то есть (разница между оцененными значениями/среднее) $\times 100 \leq 10\%$. Если это условие не выполняется, повторите анализ на двух новых аликвотах семенной плазмы.
6. Умножьте скорректированную активность глюкозидазы на общий объем спермы (мл) для получения активности глюкозидазы во всем эякуляте (мЕд).

Важно: Одна международная единица (МЕ) активности глюкозидазы определяется как продукция 1 мкмоль продукта (PNP) в минуту при 37°С. При таком анализе активность вычисляют из 15 мкл семенной плазмы при общем объеме 1,115 мкл в течение 120 мин, таким образом корректирующий коэффициент равен $(1115/15)/120 = 0,6194$.

3.4.3.6 Минимальное референсное значение

Минимальным референсным значением для нейтральной α -глюкозидазы является 20 мЕд на эякулят (Cooper et al., 1991 и неопубликованные данные Т. G. Cooper).

3.5 Компьютерный анализ эякулята

3.5.1 Введение

До настоящего момента не существовало программ, позволяющих оценить концентрацию сперматозоидов с помощью компьютера (CASA), так как трудно отличить сперматозоиды и клеточный дебрис (ESHRE, 1998). Однако достижения в этой области знаний, особенно при использовании флуоресцентного окрашивания ДНК и алгоритмов движения жгутика, сегодня позволяют определить концентрацию сперматозоидов — и концентрацию прогрессивно-подвижных сперматозоидов (Zinaman et al., 1996; Garrett et al., 2003). При условии, что будет произведен адекватный контроль при подготовке образцов и при использовании инструментария, CASA сегодня может быть применена для выполнения рутинных диагностических процедур. Контроль качества необходим для того, чтобы установить и поддерживать высокие стандарты выполнения операции (см. Главу 7).

Несколько производителей выпускают на рынок системы CASA. Эти установки способны определять подвижность сперматозоидов и их кинетику, а также некоторые рассчитывают концентрацию мужских половых клеток. Некоторые имеют полуавтоматические модули для оценки морфологии. Система CASA, включая оценку подвижности, концентрации и морфологии, имеет два преимущества по сравнению с ручным методом: высокая точность и получение количественных данных по кинетике сперматозоидов (прямая прогрессия и гиперактивационная подвижность, характеристики капацитированных клеток).

Некоторые исследования показали существенную связь между результатами исследования концентрации и подвижности сперматозоидов, полученными с помощью CASA, с частотой оплодотворения *in vitro* и *in vivo*, а также временем естественного зачатия (Liu et al., 1991a; Barratt et al., 1993; Irvine et al., 1994; Krause, 1995; Donnelly et al., 1998; Larsen et al.,

2000; Garrett et al., 2003; Shibahara et al., 2004). Использование CASA для измерения подвижности сперматозоидов и их концентрации описано в Разделах 3.5.2 и 3.5.3, соответственно, при этом Раздел 3.5.4 содержит пояснения о статусе компьютерного анализа морфологии сперматозоидов.

3.5.2 Использование CASA для оценки подвижности сперматозоидов

Системы CASA лучше всего использовать для анализа кинетики сперматозоидов, так как они могут обнаружить двигающиеся клетки. Оценка процентного содержания подвижных клеток может быть ненадежной, так как она зависит от числа неподвижных сперматозоидов, а клеточный дебрис может быть ошибочно принят за неподвижные сперматозоиды.

Многие факторы негативно влияют на расчеты CASA, например обработка образца спермы, пропорции строения, концентрация сперматозоидов и глубина расчетной камеры (Davis & Katz, 1992; Mortimer, 1994a, b; Kraemer et al., 1998). Несмотря на это, надежные и воспроизводимые результаты могут быть получены, если следовать определенным правилам (Davis & Katz, 1992). Руководства по применению CASA следует обязательно использовать в работе (Mortimer et al., 1995; ESHRE, 1998).

При использовании CASA для получения параметров движения следует анализировать треки не менее 200 подвижных сперматозоидов на образце. Это значит, что нужно будет обнаружить намного больше сперматозоидов. Если сперматозоиды необходимо разбить на группы согласно их движению или планируется определить другие параметры образца, необходимо анализировать треки не менее 200, а если возможно — и 400 подвижных сперматозоидов. Число анализируемых сперматозоидов в каждом образце следует стандартизировать.

Инструментарий CASA следует соединять с компьютерным программным обеспечением, что позволит организовать данные и провести статистический анализ. Распределения многих параметров движения не подчиняются распределению Гаусса; медиана, а не среднее, поэтому больше подходит как сумма центральной тенденции каждой переменной. Измерения на одном сперматозоиде необходимо математически трансформировать до выполнения определенного статистического анализа.

3.5.2.1 Процедура

Каждый блок CASA корректно должен быть установлен для того, чтобы обеспечить оптимальную работу. Производители указывают определенные установки, но пользователям следует проверить, что инструмент работает, обеспечивая необходимую степень надежности и воспроизводимости. Использование подходящих материалов контроля качества, например видеозаписей, существенно (см. Приложение 7, Раздел A7.5). Некоторые авторы обсуждают системы CASA в своих работах (Davis & Katz, 1992; Mortimer, 1994b; ESHRE, 1998).

3.5.2.2 Подготовка образцов спермы

Образцы спермы для CASA следует собирать и готовить, как описано в Главе 2. Система CASA должна поддерживать образец при температуре 37°С, так как движение сперматозоидов чувствительно к изменению температуры. Характеристики подвижности и концентрация спермато-

зоидов могут быть оценены в неразведенном эякуляте. Подвижность сперматозоидов можно рассчитать на образцах с концентрацией спермы от 2×10^6 до 50×10^6 на мл (Garrett et al., 2003).

В образцах с высокой концентрацией сперматозоидов (например, больше 50×10^6 на мл) часто могут случаться ошибки. Такие образцы следует разводить, предпочтительно семенной жидкостью от того же пациента.

1. Центрифугируйте порцию образца спермы при 16 000 g в течение 6 мин для получения свободной от сперматозоидов семенной жидкости.
2. Разведите нативный образец спермы чистой семенной плазмой для достижения концентрации ниже 50×10^6 на мл.

Одноразовые счетные камеры глубиной 20 мкм дают надежный результат. Это двойная камерная система; обе камеры следует заполнять и оценивать. Следует анализировать несколько репрезентативных полей зрения: анализ шести полей зрения на камеру (12 полей зрения в сумме) обычно дает надежный результат. Не менее 200 сперматозоидов следует оценивать в каждой камере. Сходные принципы контроля качества применяют как стандартную оценку подвижности (см. Раздел 2.5.2).

Образцы могут быть проанализированы либо сразу, либо после записи видефрагмента. Анализ видеозаписей (с видеокассеты, CD-ROM или DVD) поддается лучшей стандартизации и выполнению процедур контроля качества (см. Приложение 7, Раздел A7.5). Производитель обычно рекомендует тип записывающего прибора, который следует использовать, и установку освещения, необходимого для максимального контраста между головками сперматозоидов и фоном.

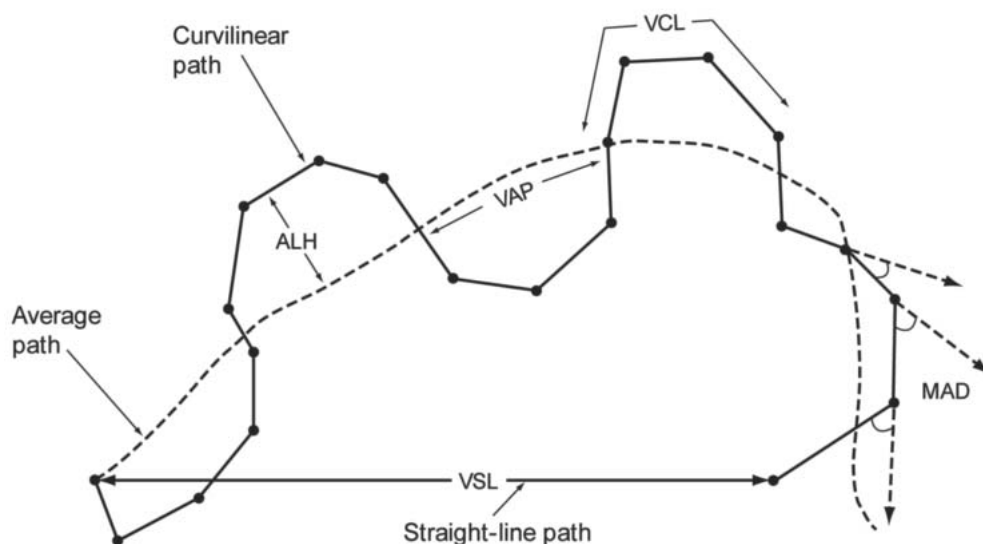
Существуют некоторые разногласия относительно того, сколько времени следует наблюдать за сперматозоидами, чтобы достигнуть точных результатов, но минимум 1 секунды достаточно для основных измерений CASA (Mortimer, 1994b).

3.5.2.3 Терминология CASA

Некоторые стандартные переменные, измеряемые с помощью систем CASA, показаны на рис. 3.3.

1. VCL, криволинейная скорость (мкм/с). Усредненная по времени скорость головки сперматозоида, двигающейся вдоль действительного криволинейного пути, описываемого в двух измерениях в микроскопе. Мера энергии клетки.
2. VSL, прямолинейная скорость (мкм/с). Усредненная по времени скорость головки сперматозоида, двигающейся вдоль прямой линии между первой и последней точками пути.
3. VAP, средняя скорость (мкм/с). Усредненная по времени скорость головки сперматозоида на ее среднем пути. Этот путь рассчитывают по сглаженной криволинейной траектории по алгоритму, заложенному в системе CASA; эти алгоритмы разные в различных системах, поэтому значения могут быть несравнимы между системами.
4. ALH, амплитуда бокового смещения головки (мкм). Величина поперечного смещения головки сперматозоида от его усредненного пути. Ам-

Рис. 3.3. Стандартные переменные, измеряемые с помощью системы CASA



Ср — криволинейный путь; Ар — средний показатель пути; S-l p — прямолинейный путь; ALH — амплитуда бокового смещения головки сперматозоида; MAD — среднее угловое смещение; VAP — средняя скорость пути; VCL — криволинейная скорость; VSL — прямолинейная скорость

плитуда может быть выражена как максимум или среднее значение таких смещений. Различные системы CASA рассчитывают ALH, используя разные алгоритмы, поэтому значения могут быть несопоставимы между собой.

5. LIN, линейность. Линейность криволинейного пути, VSL/VCL .
6. WOB, колебание. Средняя осцилляция действительного пути от усредненного пути, VAP/VCL .
7. STR, прямолинейность. Линейность среднего пути, VSL/VAP .
8. BCF, кросс-частота (Hz). Средняя частота, при которой криволинейный путь пересекает усредненный путь.
9. MAD, среднее угловое смещение (градусы). Усредненные по времени абсолютные значения мгновенного угла поворота головки сперматозоида вдоль его криволинейной траектории.

Важно: Различные системы CASA используют различные математические алгоритмы расчета большинства этих переменных движения. Сравнимость измерений всех этих систем пока не показана.

3.5.3 Использование CASA для оценки концентрации сперматозоидов

Использование флуоресцентного окрашивания ДНК вместе с CASA позволяет точно определить концентрацию подвижных сперматозоидов и процент подвижных клеток, но необходимо строгое соблюдение техники (Garrett et al., 2003). Например, если используют одноразовые камеры, важно оценить образец в нескольких различных местах камеры, так как распределение сперматозоидов внутри камеры неоднородно (Douglas-Hamilton et al., 2005b). Важна калибровка относительно гемоцитометра.

Концентрацию сперматозоидов между 2×10^6 и 50×10^6 на мл можно измерить (Garrett et al., 2003). Образцы с концентрацией сперматозоидов больше 50×10^6 на мл необходимо разводить (см. Раздел 3.5.2.2).

Комментарий: Система CASA позволяет выявлять и подсчитывать флуоресцентно окрашенные головки. Кроме микроскопической оценки не существует способа определить, является ли данный сперматозоид интактным (то есть содержит головку, прикрепленную к жгутику).

3.5.4 Компьютерная оценка морфологии сперматозоидов

Анализ видеоизображения имеет преимущества для оценки морфологии сперматозоидов по классификации, объективности и воспроизводимости результатов. Коммерческие системы доступны для оценки морфологии головок сперматозоидов и их шеек, а также основной части жгутиков. Однако дефекты всего жгутика, влияющие на подвижность, могут быть более точно оценены с использованием CASA для расчета подвижности и движения. Системы CASA в общем случае классифицируют головку сперматозоида и его шейку как нормальную либо аномальную и дают среднее и стандартное отклонение или медиану размеров головки и шейки, эллиптичность головки и ее округлость, и измерение области акросомы, зависимое от окраски.

Автоматические системы обладают большей объективностью, точностью и воспроизводимостью результатов, чем ручные методики (Menkveld et al., 1990). Точность и воспроизводимость может составлять менее 7% (Garrett & Baker, 1995), при ручной оценке опытным специалистом. Воспроизводимость и точность результатов систем оценки морфологии сперматозоидов (CASMA) могут, однако, быть связаны с методологическими неточностями, такими как фокус, освещение, подготовка препарата и его окрашивание (Lacquet et al., 1996; Menkveld et al., 1997) и с техническими трудностями в корректной дифференцировке головок сперматозоидов среди клеточного дебриса, особенно при низкой концентрации сперматозоидов (Garrett & Baker, 1995; Menkveld et al., 1997; Coetzee et al., 1999a, b). Природа автоматизированного подсчета означает, что не существует способа компенсировать недостатки препарата и артефакты. Таким образом, небольшие различия в оттенке фона относительно окраски клеток могут приводить к некорректной классификации или неспособности идентифицировать клетку как сперматозоид с последующим неудовлетворительным результатом.

Как и при ручной оценке морфологии сперматозоидов, процедуры и инструменты должны быть стандартизированы, и поддержан контроль качества для того, чтобы гарантировать сравнимые и надежные результаты. Сперма может быть обработана, как описано в Разделе 2.13.2.4 для ослабления фона для метода CASMA. Если концентрация сперматозоидов низкая ($< 2 \times 10^6$ на мл), образцы необходимо сконцентрировать центрифугированием, как описано в Разделе 2.13.2.2.

Важно: Центрифугирование может повредить морфологию сперматозоидов, поэтому ее использование должно быть отмечено.

В двух исследованиях сообщили о значительной корреляции между результатами CASMA и фертильностью. Coetzee et al. (1999c) обнаружили,

что результаты автоматического анализа морфологии сперматозоидов могут прогнозировать как процент (частоту) оплодотворения *in vitro*, так и наступление беременности. Garrett et al. (2003) показали, что процент сперматозоидов, которые имели морфологию головок сперматозоидов, окружающих зону пеллюцида («предпочитающих зону», %Z), вместе с прямолинейной их скоростью (VSL) были значительно и независимо связаны с процентом наступления беременности в большой группе субфертильных пациентов. Оказалось, что и %Z, и VSL с фертильностью прямо пропорциональны, но не определено пороговое значение, которое было бы связано с процентом наступления беременности. Требуется большее число исследований фертильности на больших когортах пациентов для улучшения применимости систем CASA для оценки морфологии сперматозоидов.

Автоматизированные системы могут быть полезны для получения данных для систем контроля качества, но необходимо проведение большего числа исследований для того, чтобы показать их преимущества для клинических целей.

ГЛАВА 4 Научные тесты

Когда нужно выполнить тесты на функциональную способность, важно, чтобы сперматозоиды были отделены от семенной жидкости в течение 1 часа после эякуляции во избежание любых повреждений от продуктов, выделяемых не сперматогенными клетками. Так как наши знания о молекулярных механизмах, регулирующих функцию сперматозоидов, накапливаются, это дает весьма большие возможности для развития новых диагностических тестов. Например, недавно получены данные о значении компактизации (конденсации) и целостности ДНК ядра для определения функциональной компетентности сперматозоидов человека.

Данные показывают ассоциацию между целостностью ДНК, организацией хроматина в сперматозоидах и фертильностью (Sakkas et al., 1998; Aitken & Krausz, 2001; Virro et al., 2004).

Подобным образом, новое понимание путей сигнальной трансдукции, регулирующих функцию сперматозоидов, предоставляет возможности для разработки диагностических тестов, которые могут дать информацию об истинной природе процессов, протекающих в дефектных сперматозоидах мужчин с бесплодием. Для того чтобы получить более точные детали биологических основ мужского бесплодия, разработан ряд функциональных тестов, нацеленных на оценку способности сперматозоидов человека осуществлять фундаментальные процессы, существенные для процесса зачатия: связывание с зоной пеллюцида, экзоцитоз акросомных ферментов и проникновение через мембрану ооцита.

4.1 Оценка свободных радикалов

4.1.1 Введение

Избыточная продукция свободных радикалов кислорода (reactive oxygen species, ROS) и высокая активность цитоплазматических ферментов, таких как креатин фосфокиназа в эякуляте могут отражать присутствие патологических сперматозоидов с чрезмерной резидуальной цитоплазматической каплей на шейке (Rao et al., 1989; Gomez et al., 1996; Aitken et al., 2004).

Свободные радикалы являются метаболитами кислорода, к ним относят анион супероксидазу, перекись водорода, радикалы гидроксила и гидропероксила, оксид азота. Эти свободные радикалы, присутствующие в избыточном количестве, могут инициировать нарушения в клетках путем индукции оксидативного повреждения клеточных липидов, белков и ДНК (Griveau & Le Lannou, 1997; Aitken et al., 2003; Henkel et al., 2004). Большинство клеток защищены либо энзимными антиоксидантными системами (супероксиддисмутаза, глутатион пероксидаза и каталаза), либо не энзимными антиоксидантными системами (мочевая кислота, витамин С, витамин Е), и в случае ослабления этих механизмов нарушается функция сперматозоидов (Agarwal et al., 2004).

В эякуляте человека свободные радикалы продуцируются как сперматозоидами (Aitken & Clarkson, 1987; Alvarez et al., 1987; Iwasaki & Gagnon, 1992), так и лейкоцитами (Aitken & West, 1990). Семенная жидкость содержит антиоксидантные агенты и ферменты, дефицит которых отме-

чают у некоторых пациентов (Jones et al., 1979; Smith et al., 1996). Именно поэтому удаление семенной жидкости при обработке спермы в программах вспомогательной репродукции (см. Главу 5) способствует защите клеток, чувствительных к перекисному окислению. Чрезмерная продукция свободных радикалов может приводить к перекисному повреждению и неспособности сперматозоидов выполнять свои функции, также как и повреждение ДНК и в ядре, и в митохондриальном геноме (Sawyer et al., 2003). Оценку выживания сперматозоидов часто используют для анализа качества сперматозоидов человека. Результаты такого анализа значительно коррелируют со статусом липидного окисления сперматозоидов (Gomez et al., 1998).

Процедура хемилюминесценции, применяющая такие соединения, как люминол или люцигенин, может быть использована для оценки выработки свободных радикалов и восстановительно-окислительной активности в сперматозоидах человека.

4.1.2 Оценка свободных радикалов, продуцируемых в сперме

4.1.2.1 Принцип

В этой процедуре используют чувствительный люминометр для измерения низкого количества света, генерируемого сперматозоидами человека в присутствии хемилюминесцентной пробы, такой как люминол. В описанном методе используют смесь люминола и пероксидазы хрена для создания чувствительных измерений генерации перекиси водорода. Другие пробы (например, люцигенин) могут быть также использованы для мониторинга продукции свободных радикалов в отмытом эякуляте человека (Aitken et al., 1992; McKinney et al., 1996).

Сигналы, генерируемые в ответ на пробу формил-метионил-лейцил-фенилаланин (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, FMLP), являются специфическими к популяции лейкоцитов, так как на поверхности сперматозоидов человека отсутствуют рецепторы к FMLP (Krausz et al., 1992). Результаты могут быть откалиброваны с помощью суспензии, содержащей известное число полиморфноядерных лейкоцитов (нейтрофилов) (см. Рис. 4.1)

Комментарий 1: Точная активность, измеряемая с помощью описанных проб, является до сих пор дискутируемым вопросом (Aitken et al., 2004), однако полученные данные отражают функцию сперматозоидов (Zorn et al., 2003; Said et al., 2004).

Комментарий 2: Один лейкоцит может генерировать свободных радикалов в 100 раз больше, чем сперматозоид. Именно поэтому низкий уровень контаминации лейкоцитами вносит основной вклад в хемилюминесцентные сигналы, генерируемые в сперме.

4.1.2.2 Реагенты

1. Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS) без фенола красного: см. Приложение, Раздел А4.5.
2. Среда Кребса-Рингера (KRM) без фенола красного: см. Приложение 4, Раздел А4.7.

3. Люминол, 25 ммоль/л: разведите 29 мг люминола (5-амино-2,3-дигидро-1, 4-фталазиндион) в 10 мл диметил сульфоксида (DMSO).
4. Пероксидаза хрена (HRP) (тип VI, 310 МЕ/мг протеина): растворите 5 мг (1550 МЕ) в 1 мл KRM.
5. FMLP (лейкоцит-специфичная проба, 10 ммоль/л): растворите 44 мг FMLP в 10 мл ДМСО.
6. Форбол 12-миристанат 13-ацетат (РМА), 1 ммоль/л основного раствора: растворите 6,2 мг РМА в 10 мл ДМСО. Разбавьте 1 ммоль/л РМА 100-кратно в ДМСО для получения 10 мкмоль/л рабочего раствора.
7. Зимосан (zymosan).
8. Желатин: 0,1% (1 г/л) в HBSS.

4.1.2.3 Опсонизация зимосаном

1. Добавьте 500 мг зимосана в 10 мл HBSS.
2. Энергично встряхните.
3. Кипятите в течение 20 мин в накрытой лабораторной чашке для предотвращения испарения.
4. Центрифугируйте при 500g в течение 5 мин.
5. Отмойте осадок в 10 мл HBSS.
6. Повторите отмывание.
7. Ресуспандируйте осадок в 5 мл свежей сыворотки крови человека аккуратно пипетированием.
8. Инкубируйте в течение 20 мин.
9. Центрифугируйте при 500g в течение 5 мин.
10. Отмойте осадок в 10 мл HBSS.
11. Повторите отмывание.
12. Ресуспандируйте осадок до концентрации 50 мг/мл в 10 мл HBSS+0,1% (1 г/л) желатины аккуратно пипетированием.
13. Храните при температуре -20°C до момента использования.

4.1.2.4 Обнаружение неспецифичной генерации свободных радикалов

1. Тщательно перемешайте образец спермы (см. Бокс 2.3) и возьмите объем, содержащий не менее 10×10^6 сперматозоидов для оценки свободных радикалов.
2. Отмойте сперматозоиды (см. Раздел 5.3) в среде Кребса — Рингера (KRM) и приготовьте концентрацию 10×10^6 сперматозоидов на мл.
3. Пипетируйте 400 мкл суспензии отмытых сперматозоидов, разбавленной в KRM без фенола красного, в имеющемся контейнере люминометра. Будьте аккуратны, чтобы избежать формирования воздушных пузырьков.
4. Добавьте 4 мкл 25 ммоль/л люминола.

5. Добавьте 8 мкл раствора пероксидазы хрена (1550 МЕ/мл).
6. Следите за хемилюминесцентными сигналами в люминометре при температуре 37°С в течение около 5 мин до стабилизации.

Генерация свободных радикалов лейкоцитами в эякуляте может быть усилена путем добавления FMLP, зимосана или PMA, но PMA также стимулирует продукцию свободных радикалов сперматозоидами.

4.1.2.5 Добавление FMLP для усиления продукции свободных радикалов лейкоцитами

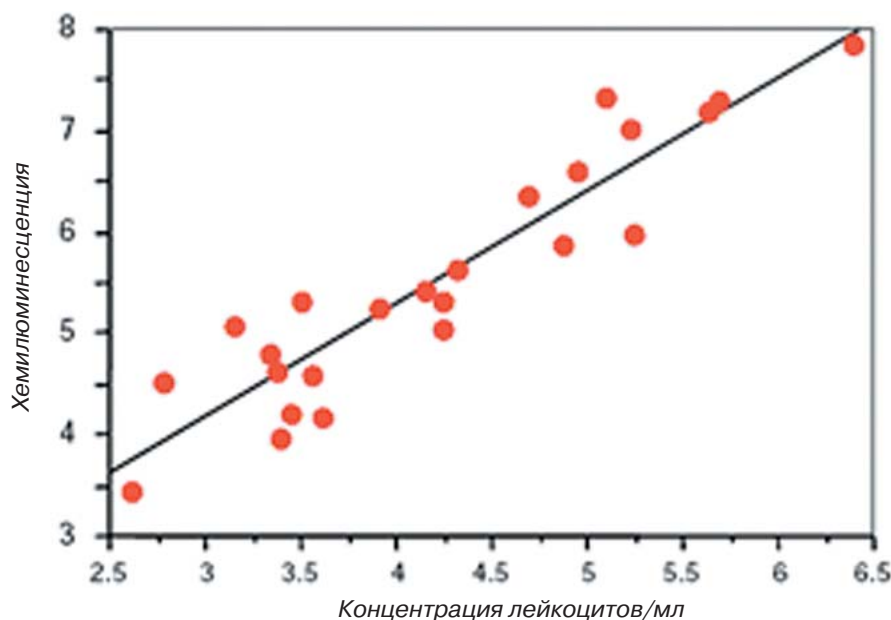
Добавьте 2 мкл 10 ммоль/л раствора FMLP к образцу для усиления хемилюминесцентного сигнала от лейкоцитов, присутствующих в суспензии спермы (см. Рис. 4.2).

4.1.2.6 Добавление зимосана для усиления продукции свободных радикалов лейкоцитами

Добавьте 20 мкл опсонизированного зимосана к образцу для усиления хемилюминесцентного сигнала от лейкоцитов, присутствующих в суспензии спермы.

Величина сгенерированного сигнала прямо пропорциональна уровню контаминации лейкоцитами (см. Рис.4.1).

Рис. 4.1 Хемилюминесценция, возникшая в ответ на обработку опсонизированным зимосаном
Линейно-логарифмическое соотношение существует между концентрацией лейкоцитов и хемилюминесцентным сигналом.



Данные любезно предоставлены R.J. Aitken.

4.1.2.7 Добавление PMA для усиления продукции свободных радикалов лейкоцитами

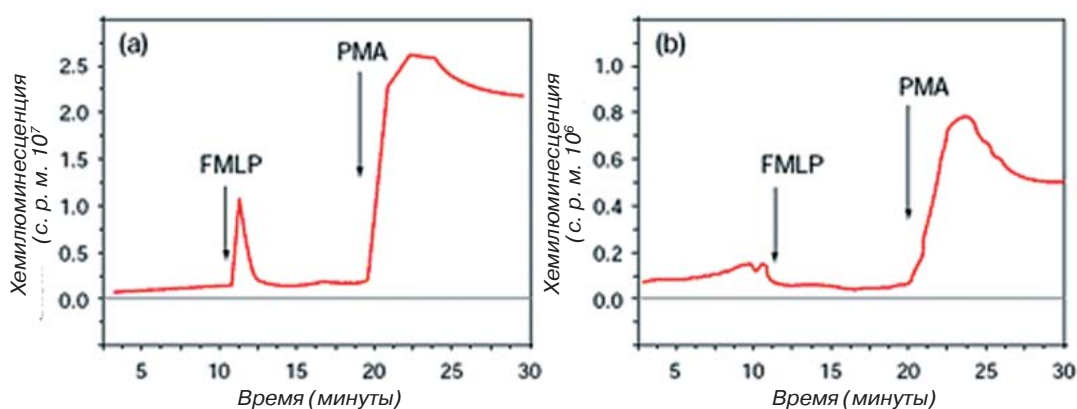
1. Разведите основной раствор PMA 100-кратно в ДМСО для получения 10 мкмоль/л рабочего раствора.

2. Дождитесь, чтобы сигнал от FMLP или опсонизированного зимосана снизился.
3. Добавьте 4 мкл в 10 мкмоль/л PMA к той же суспензии спермы (финальная концентрация 100 нмоль/л) для усиления хемилюминесцентного сигнала от сперматозоидов (см. Рис. 4.2).

Рис. 4.2 Относительный вклад лейкоцитов и сперматозоидов в генерацию свободных радикалов в суспензии спермы.

(а) В присутствии контаминации лейкоцитами наблюдается выброс генерации свободных радикалов при добавлении лейкоцит-специфической пробы FMLP. Соответствующее добавление PMA вызывает интенсивный длительный хемилюминесцентный сигнал как от сперматозоидов, так и от лейкоцитов.

(б) При отсутствии лейкоцитов FMLP-ответ незначительный, при этом PMA вызывает выраженный хемилюминесцентный сигнал от сперматозоидов (см. также Krausz et al., 1992).



FMLP — формил-метионин-лейцин-фенилаланин; PMA — форбол-12-миристан-13-ацетат

Данные предоставлены R. J. Aitken.

4.1.2.8 Результаты

Оцените график выхода продукта после стимуляции для подтверждения присутствия лейкоцитов.

4.2 Оценка взаимодействия сперматозоидов с ооцитом человека

Связывание сперматозоидов с зоной пеллюцида инициирует акросомную реакцию, высвобождение литических компонентов акросомы и пентрацию сперматозоидами матрикса оболочки ооцита за счет гиперактивации мужских половых клеток. Для оценки этих процессов используют нежизнеспособные, непригодные для оплодотворения ооциты человека, удаленные хирургическим путем из яичников или полученные в программах ЭКО. Эти тесты могут быть выполнены с использованием ооцитов, которые хранились в солевом растворе, но обычно тесты ограничены малой доступностью ооцитов человека (Yanagimachi et al., 1979; Kruger et al., 1991; Liu & Baker, 1992b; Liu et al., 2004).

4.3 Оценка связывания сперматозоидов с зоной пеллюцида человека

Один из тестов по анализу связывания сперматозоидов с зоной пеллюцида, гемизонный тест (Burkman et al., 1988), подразумевает микрорассечение зоны пеллюцида на равные половинки и тестирование обеих половинок равным количеством исследуемых и контрольных сперматозоидов. В другом тесте на связывание сперматозоидов с оболочкой ооцита (Liu et al., 1988, 1989) проводят дифференциальную окраску (мечение) тестируемых сперматозоидов одним флуоресцентным красителем (например, флуоресцеином), а контрольных — другим (например, родамином). Далее подсчитывают число и соотношение тестируемых и контрольных сперматозоидов, связанных с одной и той же интактной зоной. Как было показано, результаты оценки связывания сперматозоидов с зоной пеллюцида ооцита коррелируют с процентом оплодотворения *in vitro* (Liu & Baker, 2003).

Клинически важно оценить число связанных с зоной пеллюцида сперматозоидов у пациентов с низким процентом оплодотворения *in vitro* или при его полном отсутствии, при идиопатическом бесплодии и тератозооспермии (Franken et al., 1989; Liu & Baker, 1992a, 2004). Связывание небольшого числа сперматозоидов или полное отсутствие сперматозоидов в зоне пеллюцида обычно указывает на дефект сперматозоидов.

4.4 Оценка акросомной реакции

Физиологическая акросомная реакция происходит после связывания сперматозоида с зоной пеллюцида. Акросомная реакция, индуцированная зоной пеллюцида, может быть оценена по сперматозоидам, взятым с поверхности зоны или подвергнутых действию протеинов зоны пеллюцида ооцитов человека (Liu & Baker, 1994, 1996; Franken et al., 2000).

В случаях тератозооспермии или олигозооспермии некоторые пациенты могут иметь аномальные параметры эякулята, и при этом иметь сперматозоиды с нарушенной реакцией их связывания с зоной пеллюцида. Другие мужчины могут иметь сперматозоиды, которые проявляют нормальное связывание с зоной пеллюцида, но нарушение при тесте с акросомной реакцией (Liu et al., 2004). Эти тесты ограничены доступностью зоны пеллюцида ооцитов человека. Зоны пеллюцида ооцитов других приматов не могут быть использованы из-за их ограниченной связывающей специфичности (Bedford, 1977; Liu et al., 1991b; Oehninger et al., 1993). Другие стимуляторы, такие как ионофор кальция, будут индуцировать акросомную реакцию, но результаты теста не будут соотноситься с данными, полученными при реакции зона пеллюцида-индуцированная акросомная реакция (Liu & Baker, 1996). Акросомный статус после индукции акросомной реакции можно оценить под микроскопом или с помощью проточной цитометрии (Fenichel et al., 1989; Henley et al., 1994; Coorer & Yeung, 1998) с помощью флуоресцентных меченых лектинов, таких как *Pisum sativum* (гороховый агглютинин) (см. Раздел 4.4.1) или *Arachis hypogaea* (ореховый лектин), либо моноклональных антител против акросомного антигена CD46 (Cross, 1995).

4.4.1 Процедура флуоресцентной оценки акросомного статуса

Данный метод первоначально был разработан Cross et al. (1986) с последующей модификацией Liu & Baker (1988). Модифицированный метод более прост, воспроизводим, выдает очень понятные изображения (Рис. 4.3). Его предпочитают использовать на препаратах сперматозоидов с высокой подвижностью без контаминации лейкоцитами, незрелыми половыми клетками и мертвыми сперматозоидами. Именно поэтому следует проводить отмывание спермы либо центрифугированием в градиенте плотности (см. Раздел 5.3), либо swim-up (см. Раздел 5.4) в зависимости от качества образца эякулята.

4.4.1.1 Реагенты

1. Гороховый агглютинин (PSA), меченный флуоресцеин изотиоцианатом (FITC) (PSA-FITC).
2. Солевой фосфатный буфер (PBS), pH = 7,4.
3. NaCl, 0,9% (9 г/л): растворить 0,9 г NaCl в 100 мл дистиллированной воды.
4. Этанол 95% (v/v).
5. Основной раствор PSA: растворите 2 мг PSA-FITC в 4 мл PBS. Храните 0,5 мл аликвоты при температуре -20°C .
6. Рабочий раствор PSA: растворите 0,5 мл основного раствора PSA в 10 мл PBS и храните при температуре 4°C . Данный раствор стабилен до 4 недель.

4.4.1.2 Простое отмывание сперматозоидов

1. Тщательно перемешайте образец спермы (см. Бокс 2.3) и возьмите аликвоту около 0,2 мл.
2. Разбавьте ее до 10 мл 0,9% (9 г/л) солевым раствором.
3. Центрифугируйте при 800g в течение 10 мин.
4. Удалите надосадочную жидкость, оставив 20–40 мкл осадка.
5. Ресуспендируйте осадок эякулята в оставленном супернатанте аккуратным пипетированием.
6. Повторите процедуру отмывания.

4.4.1.3 Обработка очищенных препаратов спермы

1. Разбавьте отмывые образцы спермы методом swim-up (см. Раздел 5.4) или посредством центрифугирования в градиенте плотности (см. Раздел 5.5) до 10 мл солевым раствором.
2. Центрифугируйте при 800g в течение 10 мин.
3. Удалите надосадочную жидкость, оставив 20–40 мкл осадка.
4. Ресуспендируйте осадок эякулята в оставленном супернатанте аккуратным пипетированием.

4.4.1.4 Приготовление мазков

1. Сделайте два мазка спермы около 1 см длиной из аликвоты суспензии около 5 мкл.
2. Оцените влажные препараты в фазово-контрастном микроскопе ($\times 400$).
3. Убедитесь, что сперматозоиды равномерно распределены на предметном стекле без наслоений.
4. Высушите препараты на воздухе.
5. Зафиксируйте 95% (v/v) этанолом в течение 30 мин.
6. Высушите препараты на воздухе.

4.4.1.5 Окрашивание PSA-FITC

1. Налейте 10 мл рабочего раствора PSA-FITC в вертикальный окрашивающий сосуд.
2. Погрузите зафиксированные суховоздушные препараты в краситель PSA-FITC.
3. Проведите окрашивание в течение не менее 1 ч при температуре 4°C.
4. Отмойте каждое предметное стекло в дистиллированной воде и заключите в этанол-растворимую гистологическую среду (см. Разделы 2.14.2.4 и 2.14.2.5).

Важно: Более длительное окрашивание (более 18 ч) приводит к неправильным результатам. Более быстрое (менее 1 ч) — может затруднить анализ препарата.

4.4.1.6 Оценка

Оцените препарат с помощью флуоресцентного микроскопа при увеличении $\times 400$ под иммерсионным маслом при длине волны 450–490 нм. Распределяйте сперматозоиды по следующим категориям.

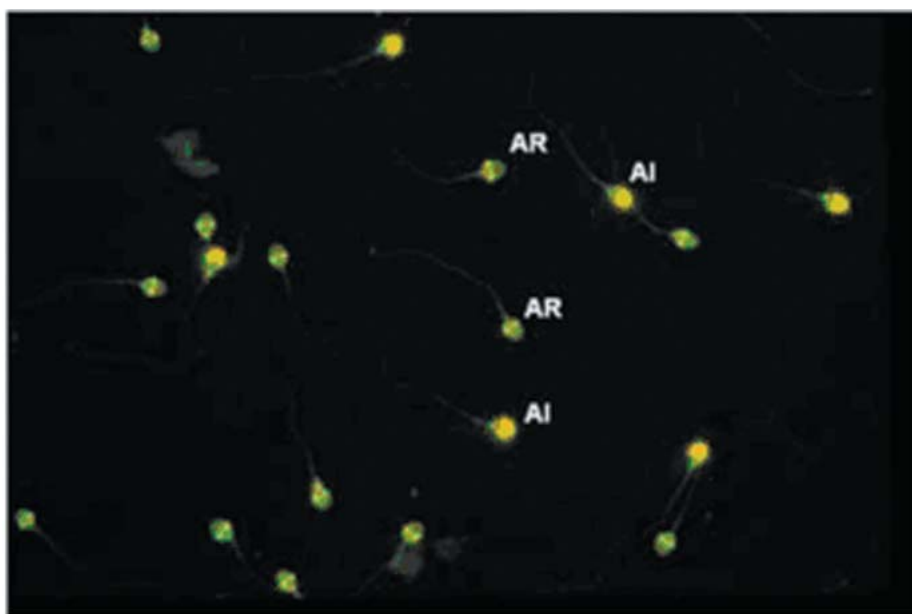
1. Акросома интактна (AI): сперматозоиды, у которых более половины головки светится и полностью флуоресцирует (см. Рис. 4.3).
2. Прореагировавшая акросома (AR): сперматозоиды с флуоресцентной меткой только в экваториальной области либо без флуоресцентного окрашивания всей акросомной области (см. Рис. 4.3).
3. Аномальная акросома: все остальные сперматозоиды.

4.4.1.7 Подсчет сперматозоидов с прореагировавшей акросомой

1. Подсчитайте число сперматозоидов каждой категории (AI и AR) с помощью лабораторного счетчика.
2. Оцените 200 сперматозоидов на каждом препарате для получения приемлемо низкой статистической ошибки (см. Бокс 2.5).
3. Рассчитайте среднее значение и различие между двумя значениями числа сперматозоидов с прореагировавшей акросомой для двух препаратов.

4. Определите приемлемость различия из Табл. 2.1 или Рис. А7.2, Приложение 7 (Каждое показывает максимальное различие между двумя процентными значениями, которые, как ожидается, попадут в 95% доверительный интервал.)
5. Если различие в процентных значениях приемлемо, запишите средний процент сперматозоидов с прореагировавшей акросомой. Если различие слишком большое, повторите оценку на двух стеклах (см. Бокс 2.6).
6. Запишите средний процент сперматозоидов с прореагировавшей акросомой как ближайшее целое число.

Рис. 4.3 Показаны сперматозоиды, окрашенные флуоресцентным агглютинином *Pisum sativum* (PSA): сперматозоиды человека с интактной акросомой (AI), окрашена проксимальная часть головки (акросома), и с прореагировавшей акросомой (AR), окрашена экваториальная или постакросомная область.



Микрофотография любезно предоставлена H.W.G. Baker.

4.4.2 Оценка индуцированной акросомной реакции

Акросомная реакция — это процесс экзоцитоза, который происходит после связывания сперматозоидов с зоной пеллюцида и который должен происходить до того, как сперматозоид сможет пенетрировать оболочки ооцита и проникнуть в ооцит. Выброс кальция, как полагают, инициирует нормальную акросомную реакцию. Индуцирование выброса кальция с помощью ионофора кальция — один из путей протестировать способность капацированного сперматозоида подвергаться акросомной реакции (Aitken et al., 1993). Этот принцип лежит в основе данного анализа, также называемого тестом на акросомную реакцию после выброса ионофора (ARIC-test). Однако должна быть доказана целесообразность оценки в клинической практике индуцированной акросомной реакции.

4.4.2.1 Реагенты

1. Среда Ham F-10 (см. Приложение 4, Раздел А4.4), содержащая 3,5% (35 г/л) сывороточного альбумина человека (ЧСА).

2. Основные растворы Biggers, Whitten и Whittingham (BWW): см. Приложение 4, Раздел A4.1.
3. Диметил сульфоксид (ДМСО).
4. Основной раствор ионофора A23187, 1 ммоль/л: растворите 5,23 мг A23187 в 10 мл ДМСО.
5. Глютаральдегид 3% (v/v) или этанол 70% (v/v).

4.4.2.2 Процедура

1. Оставьте нативный эякулят на 30–60 мин для полного разжижения.
2. Подготовьте свежую среду Ham F-10–HSA для индукции капацитации для каждого анализа.
3. Нагрейте среду до 37°С до использования, предпочтительно инкубируя ее в атмосфере 5% (v/v) CO₂.
4. Подготовьте аликвоту сперматозоидов с высокой подвижностью, без контаминации лейкоцитами, незрелыми половыми клетками и мертвыми сперматозоидами, с помощью центрифугирования эякулята в градиенте плотности (см. Раздел 5.5) с использованием свежей среды Ham F-10 HSA.
5. Подготовьте контрольную и вторую тестируемую пробирку, каждая должна содержать приблизительно 1 мл суспензии спермы с концентрацией 1×10^6 подвижных сперматозоидов.
6. Инкубируйте суспензии спермы в течение 3 ч при температуре 37°С в атмосфере 5% (v/v) CO₂ для индукции капацитации (уберите крышки с пробирок для лучшей циркуляции газа). Если инкубатор с CO₂ недоступен, используйте среды с буфером Hepes (см. Приложение 4, Раздел A4.1, Важно 1) и плотно закрытые крышки пробирок, инкубируйте при температуре 37°С.
7. Добавьте 10 мкл основного раствора A23187 (1 ммоль/л) во вторые тестовые пробирки до финальной концентрации 10 мкмоль/л.
8. Добавьте 10 мкл ДМСО в контрольную пробирку.
9. Инкубируйте все пробирки при температуре 37°С в течение 15 мин.
10. Возьмите небольшую аликвоту из каждой пробирки для определения подвижности сперматозоидов.
11. Остановите реакцию добавлением 100 мкл 3% (v/v) глютаральдегида или 70% (v/v) этанола.
12. Перенесите зафиксированные сперматозоиды на предварительно очищенное предметное стекло и высушите на воздухе.
13. Окрасьте сперматозоиды флуоресцентными метками (см. Раздел 4.4.1.5).
14. Оцените препараты с помощью флуоресцентного микроскопа при увеличении $\times 400$ под иммерсионным маслом при длине волны 450–490 нм.
15. Проанализируйте процент сперматозоидов с прореагировавшей акросомой в исследуемом (тест %AR) и контрольном образцах (контроль %AR).

4.4.2.3 Оценка

1. Акросомная реакция после выброса ионофора (ARIC) — тестируемое значение %AR минус контрольное значение %AR.
2. Нормальным различием считают значение около 15% сперматозоидов с прореагировавшей акросомой.
3. Значения ниже 10% считают аномальными.
4. Значения между 10% и 15% подразумевают, что функция сперматозоидов может быть нарушена.
5. Контрольные значения выше 15% указывают на спонтанную или преждевременную акросомную реакцию.

4.4.2.4 Контроль качества

1. Образец с положительным контролем (сперма, полученная от мужчины, чьи сперматозоиды хорошо реагируют на ионофор, >15% сперматозоидов с прореагировавшей акросомой) следует использовать каждый раз при выполнении теста.
2. Каждый раз следует готовить новый контейнер с окраской, чтобы избежать перекрестного окрашивания с предыдущими образцами и получения точных результатов.

4.5 Тест с ооцитами хомячка, лишенными зоны пеллюцида

Проникновение сперматозоидов человека в ооцит хомячка функционально является тем же механизмом, что и проникновение через мембрану ооцита человека, так как оно инициировано плазматической мембраной, окружающей экваториальный сегмент головки сперматозоида человека после акросомной реакции. Отличие теста «проникновение сперматозоида человека в ооцит хомячка» от физиологической ситуации заключается в отсутствии зоны пеллюцида у ооцита хомячка. Стандартный протокол проведения теста приведен ниже.

Комментарий: Результаты обычного теста с ооцитами хомячка зависят от возникновения спонтанной акросомной реакции в популяции ооцитов, инкубированных в течение продолжительного периода времени *in vitro*. В связи с тем, что этот процесс менее эффективен, чем в естественных условиях, и в них задействованы разные механизмы, часто отмечают ложно-отрицательные результаты (мужчины, чьи сперматозоиды не прошли теста с ооцитами хомячка, но при этом успешно оплодотворяли ооциты человека *in vitro* или *in vivo*) (WHO, 1986). Несмотря на такое ограничение, тест дает информацию о проникающей способности мембран головок капцитированных сперматозоидов.

Выброс кальция и цитоплазматическое ощелачивание — два ключевых внутриклеточных сигнала, которые инициируют акросомную реакцию после взаимодействия сперматозоидов с зоной пеллюцида. Так как оба эти сигнала могут быть созданы искусственно при помощи двухвалент-

ного катиона ионофора (Aitken et al., 1993), также описан альтернативный метод с использованием сперматозоидов, стимулированных ионофором.

4.5.1 Протокол

4.5.1.1 Реагенты

1. Основной раствор BWW: см. Приложение 4, Раздел A4.1.
2. Гиалуронидаза (300–500 МЕ/мг).
3. Трипсин типа I (10 000 BAEE Ед/мг).
4. Воск (температура плавления 48–66°С).
5. Вазелин.
6. Минеральное масло.
7. Ооциты хомячка без зоны пеллюцида: их можно приобрести или получить при суперовуляции самок хомячков (см. Бокс 4.1).
8. Диметил сульфоксид (ДМСО).
9. Основной раствор ионофора (для альтернативного протокола)
1 ммоль/л: растворить 5.23 мг двухвалентного катиона ионофора A23187 в 10 мл ДМСО.

4.5.1.2 Стандартный протокол, не содержащий ионофор кальция

1. Тщательно перемешайте образец спермы (см. Бокс 2.3).
2. Отмойте образец центрифугированием в градиенте плотности (Раздел 5.5) или методом swim-up (см. Раздел 5.4).
3. Удалите большую часть супернатанта.
4. Перемешайте осадок аккуратным пипетированием и оцените концентрацию сперматозоидов в осадке (см. Разделы 2.7 и 2.8).
5. Разведите осадок до концентрации приблизительно 10×10^6 сперматозоидов на мл приблизительно в 0,5 мл среды.
6. Наклоните пробирку под углом 45° для увеличения площади поверхности.
7. Инкубируйте суспензию сперматозоидов в течение 18–24 ч при температуре 37°С в атмосфере 5% (v/v) CO₂ для индукции капацитации (откройте крышки пробирок для циркуляции газов). Если инкубатор с CO₂ недоступен, используйте среды с буфером Hepes (см. Приложение 4, Раздел A4.1, Важно 1) и плотно закрытые крышки пробирок, инкубируйте при температуре 37°С.
8. Верните пробирки в вертикальное положение на 20 мин для осаждения неподвижных клеток после капацитации.
9. Аспирируйте подвижные сперматозоиды с верха супернатанта, стараясь не захватить мертвые сперматозоиды на поверхности, и перенесите их в новую пробирку.

10. Доведите концентрацию до $3,5 \times 10^6$ подвижных сперматозоидов на мл с помощью среды.
11. С помощью пипетки с положительным замещением аспирируйте определенный объем (50–150 мкл) суспензии сперматозоидов и медленно распределите их в маленькой чашке Петри. Пластиковой одноразовой пипеткой аккуратно покройте чашку предварительно нагретым и эквilibрированным в CO_2 минеральным маслом, не расплескивая каплю со спермой. Добавьте достаточное количество масла, чтобы вся суспензия сперматозоидов была им покрыта.

4.5.1.3 Дополнительный протокол с использованием ионофора кальция (Ca^{2+})

1. Подготовьте фракцию сперматозоидов с высокой подвижностью с помощью центрифугирования в градиенте плотности, как описано в Разделе 5.5.
2. Аспирируйте осадок под средой с 80% градиентом плотности и перенесите его в 8 мл BWW.
3. Центрифугируйте клетки при 500 g в течение 5 мин.
4. Отделите большую часть супернатанта, смешайте осадок аккуратным пипетированием.
5. Оцените концентрацию сперматозоидов в осадке (см. Раздел 2.7 и 2.8) и разведите его приблизительно до 5×10^6 подвижных сперматозоидов на мл свежим раствором BWW.
6. Добавьте 1,25 и 2,5 мкл A23187 основного раствора (1 ммоль/л), возьмите 1-мл аликвоты суспензии сперматозоидов для достижения двух финальных концентраций 1,25 и 2,5 мкмоль/л, соответственно.
7. Инкубируйте сперматозоиды с ионофором в течение 3 ч при температуре 37°C .
8. Центрифугируйте клетки при 500g в течение 5 мин.
9. Удалите большую часть супернатанта и аккуратно пипетируйте осадок.
10. Оцените процент подвижных сперматозоидов.
11. Доведите концентрацию приблизительно до $3,5 \times 10^6$ подвижных сперматозоидов на мл свежим раствором BWW. Правильный результат можно получить при концентрации не ниже 1×10^6 подвижных сперматозоидов на мл (Aitken & Elton, 1986).
12. Поместите сперматозоиды под минеральное масло, как описано в Разделе 4.5.1.2, этап 11.

Важно: Кривая доза-эффект при обработке ионофором варьирует для разных пациентов, поэтому предпочтительно тестировать обе концентрации ионофора.

Бокс 4.1 Индукция овуляции у хомячков

Убедитесь, что все законные требования по способам инъектирования животных выполнены. Приготовьте растворы подходящих доз сыворо-

точных гонадотропинов беременных (жеребых) кобыл (PMSG) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). Распределите их по небольшим сосудам. Храните при температуре -20°C до использования. Сделайте инъекции неполовозрелым или половозрелым хомячкам на день 1 эстрального цикла внутривентрально 30 МЕ PMSG. После 48–72 ч инъектируйте им 40 МЕ ХГЧ внутривентрально. Возьмите животных за спину и оттяните кожу брюшной полости одной рукой, другой введите гормон в брюшную полость (выше бедренного сустава) с помощью 1 мл шприца с иглой 21 G. Меняйте иглы для каждого животного для легкого проникновения через кожу и минимального дискомфорта для животных.

4.5.1.4 Обработка яичников

1. Через 18 ч после инъекции ХГЧ проводите извлечение ооцитов из животных, забитых согласно методам, разрешенным комитетом по использованию лабораторных животных.
2. Поместите хомячков на спину и обработайте шерсть брюшной стенки 95% (v/v) этанолом.
3. Закрепите кожу зубчатым пинцетом и прорежьте ножницами кожу и мышечные ткани для обнажения матки и яичников.
4. Протрите зубчатый пинцет и ножницы 95% (v/v) этанолом.
5. Продвиньте кишечник в брюшную полость для обнажения рогов матки.
6. Возьмите один рог матки зубчатым пинцетом и поднимите его над брюшной полостью для обнажения яйцевода, яичников и овариальной связки.
7. Удерживайте большую часть рога матки зубчатым пинцетом и отрежьте кончик матки ниже пинцета. Вырежьте яичник и поместите его в теплый раствор (37°C) BWW в небольшую чашку Петри.
8. Обработайте второй яичник таким же образом.

4.5.1.5 Сбор ооцит-кумулюсных комплексов

1. Оцените яичники в диссекционном микроскопе на содержание ооцит-кумулюсных комплексов в набухших яйцеводах.
2. Удерживайте яйцевод зубчатым пинцетом и проколите набухший яйцевод иглой 21 G. Ооцит-кумулюсные комплексы будут выпадать в месте пункции.
3. Иглой разъедините клетки кумулюса. Сожмите яйцевод зубчатым пинцетом для удаления всей массы кумулюса.

4.5.1.6 Выделение и обработка ооцитов

1. Соберите клетки кумулюса с помощью иглы и шприца и поместите их в часовое стекло, чашку или любой другой подходящий сосуд, содержащий 0,1% (1 г/л) гиалуронидазы (300–500 МЕ/мл), уравновешенный в CO_2 среде.

2. Инкубируйте сосуд, накрытый алюминиевой фольгой для защиты от света, в течение 10 мин при комнатной температуре. Наблюдайте отделение клеток кумулюса в диссекционном микроскопе.
3. Используйте вытянутые на огне стеклянные пипетки (см. Бокс 4.2) для переноса свободных ооцитов из гиалуронидазы в теплую уравновешенную среду BWW.
4. Отмойте вынутые ооциты дважды в BWW путем переноса их в свежие капли теплог уравновешенного раствора BWW. Это возможно сделать в стеклянной многолуночной чашке или на пластинке с лунками. Отмойте пипетку в BWW между переносами каждого ооцита.
5. Обработайте ооцит 0,1% (1 г/л) раствором трипсина (10 000 ME/мл) в течение приблизительно 1 мин при комнатной температуре для удаления зоны пеллюцида. Оцените удаление зоны в диссекционном микроскопе и уберите ооциты из раствора, как только зона будет полностью удалена.
6. Отмойте ооциты три раза или более в BWW.
7. Нагрейте выделенные ооциты до 37°С и поместите их в суспензию со сперматозоидами. Либо их можно сохранить при температуре 4°С в течение не более 24 ч до момента использования.

Бокс 4.2 Приготовление стеклянных пипеток

Поворачивайте стеклянную капиллярную трубку или пипетку Пастера над горелкой, удерживая концы стеклянной трубки двумя руками, крутите ее вперед и назад для равномерного нагревания стекла. Как только стекло начнет плавиться, быстро разведите руки в стороны. Переломите образовавшуюся стеклянную нить на желаемой ширине кончика пипетки (приблизительно 1 мм). Прикрепите другой конец пипетки к 1 мл шприцу.

4.5.1.7 Ко-культивирование гамет

1. Распределите ооциты хомячка, лишённые зоны пеллюцида, в несколько отдельных чашек, не более 5 ооцитов на чашку (то есть для 20 ооцитов на образец спермы подготовьте 4 аликвоты из 5 ооцитов в чашке).
2. Поместите группу из 5 ооцитов в стеклянную пипетку с минимальным количеством среды так, чтобы слишком сильно не разводить суспензию сперматозоидов.
3. Поместите кончик пипетки непосредственно в центр чашки с суспензией спермы и медленно выпустите ооциты. Поддерживайте положительное давление для предотвращения попадания минерального масла в пипетку, убедитесь в отсутствии воздушных пузырьков в суспензии спермы.
4. Удалите все масло из пипетки после ее удаления из суспензии сперматозоидов.
5. Повторите пункт 3 до того момента, пока все ооциты не будут помещены в суспензию сперматозоидов.
6. Промывайте пипетку в BWW после каждого переноса ооцита для предотвращения перекрестной контаминации сперматозоидами.

7. Инкубируйте гаметы в течение 3 ч при температуре 37°С в атмосфере 5% (v/v) CO₂.
8. Удалите ооциты из капель масла. Убедитесь, что масло отсутствует в кончике пипетки до переноса ооцитов в BWW.
9. Аккуратно отмойте ооциты со связанными сперматозоидами с помощью вытянутой стеклянной пипетки Пастера в растворе BWW.

4.5.1.8 Анализ ооцитов

1. Поместите четыре опорные капли смеси воск-вазелин (см. Бокс 3.1) в прямоугольную чашку для удержания покровного стекла по углам (22 × 22 мм, толщина номер 1,5; 0,17 мм).
2. Поместите небольшую каплю ооцит+раствор BWW в центре четырех опорных капель.
3. Опустите покровное стекло на капли воска и аккуратно надавите на него до начала распластывания ооцитов. Необходимы хорошо распластанные ооциты для оптимального наблюдения деконденсированных головок сперматозоидов.
4. Если необходимо, добавьте небольшое количество BWW на стекло для предотвращения сжатия ооцитов.
5. Оцените препараты в фазово-контрастном микроскопе при увеличении ×200.
6. Подсчитайте число деконденсированных головок сперматозоидов с прикрепленными и тесно связанными жгутиками (см. Рис. 4.4).
7. Запишите процент ооцитов, пенетрированных по крайней мере одним сперматозоидом и число сперматозоидов на пенетрированный ооцит.
8. Запишите присутствие любого числа сперматозоидов, которые остались связанными с ооцитом после первоначальной отмытки, так как это может некоторым образом указывать на часть сперматозоидов, которые подверглись акросомной реакции.

4.5.1.9 Контроль качества

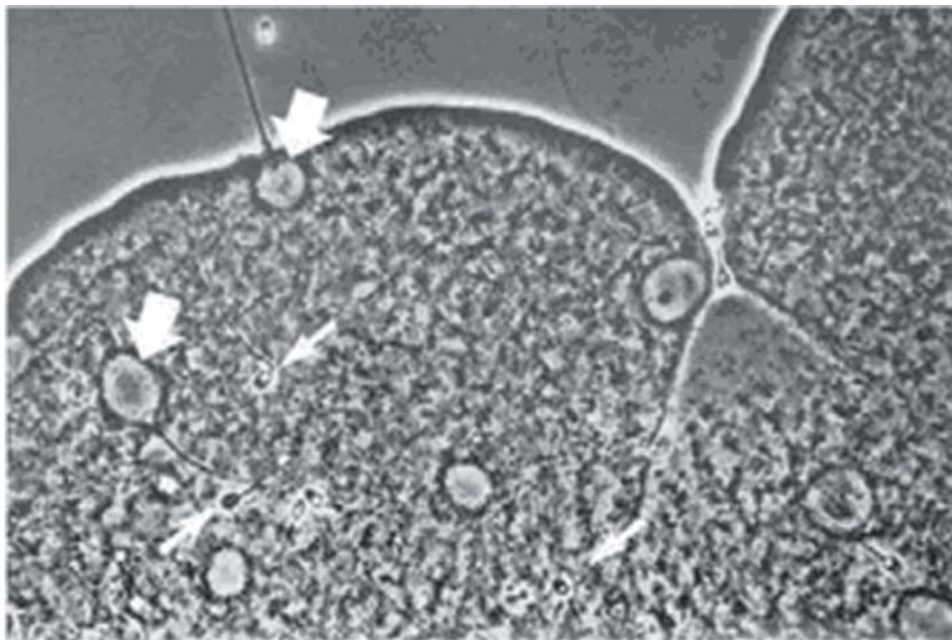
Анализ должен проводиться с положительным контролем спермы, имеющей >50% пенетрации.

4.6 Оценка хроматина сперматозоидов

По некоторым используемым методам оценивают целостность хроматина и ДНК сперматозоида. В данных методах применяют краситель, который связывается с гистонами (анилин голубой) или нуклеиновыми кислотами (акридин оранжевый, хромомицин), и оценивают гистологически или с помощью проточной цитометрии. Более новые методы основаны на оценке разрывов ДНК, такие как мечение терминальных концов (или метод TUNEL, *in situ* end-labelling, ISEL), оценку comet или рассеивание хроматина сперматозоидов (SCD). Результаты этих тестов коррелируют друг с другом (Chohan et al., 2006), а также с морфологией,

Рис.4.4 Фазово-контрастная микрофотография ооцита хомячка без зоны пеллюцида, содержащего сперматозоиды человека

Широкой стрелкой показано присутствие деконденсированных головок сперматозоидов в ооплазме; узкие стрелки на поверхности ооцита указывают на сперматозоиды, не проникшие через мембрану.



Воспроизведено из Aitken et al. (1983) с любезного разрешения Springer Science+Business Media.

подвижностью и жизнеспособностью сперматозоидов. Они могут дать дополнительную информацию о проценте оплодотворения в стандартных циклах ЭКО и, возможно, при естественных беременностях. Анализ структуры хроматина сперматозоида (SCSA) может прогнозировать нарушение оплодотворения *in vivo* и *in vitro* (Evenson & Wixon, 2006). Однако существует ли корреляция между результатами этих тестов и процентом выкидышей, а также другими исходами беременностей, до сих пор неясно.

ЧАСТЬ 2

ОБРАБОТКА ЭЯКУЛЯТА ЧЕЛОВЕКА

ГЛАВА 5 Методы обработки эякулята

5.1 Введение

Сперматозоиды бывает необходимо отделить от семенной плазмы для различных целей, таких как диагностические тесты функциональных характеристик сперматозоидов и терапевтические процедуры, такие как инсеминация и вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ). Если тесты на функциональные характеристики сперматозоидов необходимо провести, важно, чтобы сперматозоиды были выделены из семенной жидкости в течение 1 ч после эякуляции для того, чтобы ограничить их любое повреждение от продуктов не сперматогенных клеток.

Комментарий 1: Расчет слишком малого числа сперматозоидов будет давать неточный результат (см. Приложение 7, Раздел А7.1.1), что может иметь последствия для диагностики и терапии (см. Приложение 7, Раздел А7.2). Однако этого невозможно избежать, когда сперматозоиды необходимы для терапевтических целей и доступно лишь небольшое их количество.

Комментарий 2: Когда получен небольшой объем спермы и подсчитано меньшее, чем рекомендовано, число сперматозоидов, точность полученных значений будет значительно снижена. В случае, когда подсчитано менее 400 сперматозоидов, запишите статистическую ошибку полученного результата для рассчитанного числа клеток (см. Табл. 2.2).

5.1.1 Случаи, когда сперматозоиды необходимо выделить из семенной плазмы

Хотя семенная плазма помогает сперматозоидам пенетрировать цервикальную слизь (Overstreet et al., 1980), некоторые ее компоненты (например, простагландины, цинк) препятствуют наступлению беременности, когда становятся природными барьерами при ВРТ, таких как внутриматочная инсеминация (ВМИ, IUI) или ЭКО (IVF). Отделение сперматозоидов человека от семенной жидкости важно для клинической практики, так как финальная порция спермы содержит высокий процент морфологически нормальных и подвижных сперматозоидов, свободна от клеточного дебриса, не сперматогенных клеток и мертвых сперматозоидов. Сперма, разведенная культуральной средой и отцентрифугированная, до сих пор используется для формирования аликвоты с нормальными характеристиками для проведения ВМИ (Boomsma et al., 2004). Однако центрифугирование в градиенте плотности и прямой метод swim up обычно предпочитают использовать для образцов с одной или более аномалией по семиологическим показателям (Morshedi et al., 2003). Сообщают, что столбики из стеклянной ваты также эффективны, как и градиент плотностей, для отделения сперматозоидов от семенной жидкости при субоптимальных характеристиках эякулята (Rhemrev et al., 1989; Johnson et al., 1996).

5.1.2 Выбор методов обработки эякулята

Выбор методов обработки эякулята продиктован природой образца спермы (Canale et al., 1994). Например, прямой метод swim-up часто используют, когда характеристики образца эякулята приближены к нормативным значениям, при этом в случаях тяжелой олигозооспермии, тератозооспермии или астенозооспермии обычно предпочитают центрифугирование в градиенте плотностей, так как может быть получено большее число подвижных сперматозоидов. Метод градиент плотностей может быть модифицирован для оптимизации обработки эякулята с индивидуальными свойствами: общий объем материала градиента может быть уменьшен, что ограничивает расстояние, через которое мигрируют сперматозоиды, это максимизирует суммарное число подвижных сперматозоидов в окончательной фракции, или может быть увеличено время центрифугирования для образцов с высокой вязкостью.

Каждой лаборатории следует определить центростремительную силу и время центрифугирования, необходимые для получения пригодного осадка эякулята. Когда число сперматозоидов очень низкое, может быть необходимо изменить центростремительную силу или время центрифугирования для того, чтобы увеличить шанс получения максимального числа сперматозоидов. Модификации по времени и центростремительной силе следует тщательно протестировать до клинического применения. Большинство применимых методов обработки эякулята можно идентифицировать по оценке функциональных характеристик полученных сперматозоидов, например, определяемых с помощью теста на пенетрацию лишенных прозрачной оболочки ооцитов хомячка (см. Раздел 4.5).

5.1.3 Эффективность отделения сперматозоидов от семенной жидкости и инфекционных организмов

Эффективность метода выделения сперматозоидов обычно выражают в абсолютном количестве сперматозоидов, общем числе подвижных сперматозоидов или проценте морфологически нормальных сперматозоидов. Метод swim-up в общем случае обеспечивает более низкий процент выделения морфологически нормальных подвижных сперматозоидов (<20%), по сравнению с центрифугированием в градиенте плотности (>20%) (но см. Ng et al., 1992). Методы swim-up и центрифугирование в градиенте плотности также дают разные уровни контаминации компонентами семенной плазмы в окончательной фракции спермы. Используя секрецию цинка простатой в качестве маркера растворимых компонентов семенной жидкости, Björndahl et al. (2005) показали зависимое от времени распределение цинка из семенной плазмы во всплывающую фракцию при выполнении метода swim-up. Окончательная концентрация цинка в препаратах по методу swim-up была выше, чем после использования центрифугирования в градиенте плотности. Образцы спермы могут содержать возбудителей опасных инфекционных болезней, поэтому лабораторный персонал должен соблюдать предельную осторожность. Методы обработки эякулята нельзя считать 100% эффективными по удалению возбудителей инфекционных заболеваний из спермы (см. Раздел 5.6). Нормы безопасности, описанные в Приложении 2, следует строго соблюдать. Принцип good laboratory practice (Стан-

дарты GLP) является фундаментальным для соблюдения безопасности лабораторного персонала (WHO, 2004).

5.2 Общие принципы

Три простые метода обработки спермы описаны в следующих разделах. Для всех них предполагаемая культуральная среда сбалансирована солевым раствором, обогащенным протеином, и содержит буфер, подходящий для условий окружающей среды, в которых обрабатывают сперматозоиды. Для процедур вспомогательных репродуктивных технологий, таких как внутрицитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ), экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), искусственная внутриматочная инсеминация (ВМИ) или перенос гамет в фаллопиевы трубы (ГИФТ), обязательно, чтобы сывороточный альбумин человека был высокоочищенным и не содержал контаминации вирусами, бактериями и прионами. Альбумины, специально разработанные для таких процедур, коммерчески доступны. Если инкубатор содержит только атмосферный воздух и поддерживает температуру 37°С, среда должна быть обогащена перес либо подобным буфером, а крышки пробирок следует плотно закрывать. Если атмосфера инкубатора содержит 5% (v/v) CO₂ в воздухе при температуре 37°С, наилучшим буфером служит бикарбонат натрия или подобный ему, а крышки пробирок не следует плотно закрывать для газообмена. Строгое соблюдение этих правил гарантирует, что pH культуры будет благоприятна для выживания сперматозоидов. Окончательная порция приготовленных сперматозоидов будет определяться, исходя из подходящей буферной среды. Например, оценка функциональной способности сперматозоидов в общем случае потребует среду, обеспечивающую емкость сперматозоидов, и обычно содержащую бикарбонат натрия (25 ммоль/л). Сперму следует собирать, соблюдая стерильность (см. Раздел 2.2.3). Стерильность методов и расходных материалов существенна, когда обработанную сперму планируют использовать для терапевтических целей.

5.3 Простое отмывание

Такая процедура простого отмывания дает самое большое количество сперматозоидов и применима, если образец спермы обладает хорошим качеством. Эту процедуру часто применяют для подготовки спермы к проведению внутриматочной инсеминации.

5.3.1 Реагенты

1. Растворы BWW, Earle, Ham F-10 или трубной жидкости человека (human tubal fluid, HTF) (коммерчески доступны или см. Приложение 4, Разделы A4.1, A4.3, A4.4 и A4.6), обогащенные человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) или сывороткой, как описано ниже.
2. ЧСА, высокоочищенный, без контаминации вирусами, бактериями, прионами и эндотоксинами.

3. Обогащение ЧСА: к 50 мл среды добавить 300 мг ЧСА, 1,5 мг пирувата натрия, 0,18 мл лактата натрия (60% (v/v) очищенный концентрат) и 100 мг бикарбоната натрия.
4. Обогащение сывороткой: к 46 мл среды добавить 4 мл термоактивированной сыворотки пациента (56°С в течение 20 мин), 1,5 мг пирувата натрия, 0,18 мл лактата натрия (60% (v/v) очищенный концентрат) и 100 мг бикарбоната натрия.

5.3.2 Процедура

1. Тщательно перемешайте образец спермы (см. Бокс 2.3).
2. Разведите весь образец спермы 1+1 (1:2) специально приготовленной средой, чтобы способствовать удалению семенной плазмы.
3. Перенесите разведенную суспензию в центрифужную пробирку, при этом предпочтительный объем не должен превышать 3 мл на пробирку.
4. Центрифугируйте при 300–500 g в течение 5–10 мин.
5. Аккуратно аспирируйте и удалите супернатант.
6. Ресуспенсируйте осадок эякулята в 1 мл специальной среды аккуратным пипетированием.
7. Центрифугируйте снова при 300–500 g в течение 3–5 мин.
8. Аккуратно аспирируйте и удалите супернатант.
9. Ресуспенсируйте осадок эякулята аккуратным пипетированием в объеме среды, подходящей для окончательной приготовления, например, для инсеминации разведите так, чтобы концентрацию и подвижность можно было определить (см. Разделы 2.5 и 2.7).

Важно: Количество отмываний для удаления семенной жидкости можно снизить при использовании пробирок меньшего объема и увеличения объема образца в каждой пробирке. Если это сделать, центробежная сила и продолжительность центрифугирования должны быть увеличены, чтобы получить полное осаждение сперматозоидов, например, 500–600 g в течение 8–10 мин.

5.4 Прямой метод swim-up

Сперматозоиды могут быть разделены, благодаря их способности выплывать из семенной жидкости в культуральную среду. Такой метод получил название swim-up. Сперму предварительно не следует разводить и центрифугировать до проведения процедуры swim-up, так как это может привести к пероксидазному повреждению мембран сперматозоидов (Aitken & Clarkson, 1988). Таким образом, прямой метод swim-up отделения сперматозоидов от семенной плазмы предпочтителен для выделения подвижных сперматозоидов (см., например, Mortimer, 1994a, b). Прямой метод swim-up может быть выполнен либо наслаиванием культуральной среды на разжиженный эякулят, либо подслаиванием спермы

под культуральную среду. Затем подвижные сперматозоиды перемещаются в культуральную среду. Эта процедура дает более низкое количество сперматозоидов, чем отмывание, но помогает отобрать их по подвижности, и полезна, когда количество подвижных сперматозоидов в сперме низкое, например, для ЭКО или ИКСИ.

5.4.1 Реагенты

1. Растворы BWW, Earle, Ham F-10 или HTF (Приложение 4, Разделы A4.1, A4.3, A4.4 и A4.6) с добавлением ЧСА или сыворотки, как описано ниже.
2. ЧСА, высокоочищенный, без контаминации вирусами, бактериями, прионами и эндотоксинами.
3. Обогащение ЧСА: к 50 мл среды добавить 300 мг ЧСА, 1,5 мг пирувата натрия, 0,18 мл лактата натрия (60% (v/v) очищенный концентрат) и 100 мг бикарбоната натрия.
4. Обогащение сывороткой: к 46 мл среды добавить 4 мл термоактивированной сыворотки пациента (56°С в течение 20 мин), 1,5 мг пирувата натрия, 0,18 мл лактата натрия (60% (v/v) очищенный концентрат) и 100 мг бикарбоната натрия.

5.4.2 Процедура

1. Тщательно перемещайте образец спермы (см. Бокс 2.3).
2. Поместите 1 мл спермы в стерильную 15 мл коническую центрифужную пробирку, аккуратно наслоите 1,2 мл обогащенной среды на эякулят. Либо аккуратно подслоите сперму под культуральную среду.
3. Наклоните пробирку под углом 45° для увеличения площади поверхности и инкубируйте в течение 1 часа при температуре 37°С.
4. Аккуратно верните пробирку в вертикальное положение и удалите 1 мл верхней культуральной среды. Она будет содержать максимальное количество подвижных сперматозоидов.
5. Разведите ее 1,5–2,0 мл обогащенной средой.
6. Центрифугируйте при 300–500 g в течение 5 мин и удалите супернатант.
7. Ресуспендируйте осадок эякулята в 0,5 мл обогащенной среды для оценки концентрации сперматозоидов, их общей подвижности и прогрессивно-подвижной фракции (см. Разделы 2.5 и 2.7).
8. Образец можно использовать сразу для терапевтических или исследовательских целей.

5.5 Градиент плотностей

Центрифугирование в градиенте плотностей может дать наилучший отбор сперматозоидов хорошего качества, обеспечив также хорошее их отделение от округлых клеток и клеточного дебриса. Метод проще стандартизировать, чем метод swim-up, поэтому результаты являются более

согласованными. Этот метод используют, чтобы отделить и подготовить сперматозоиды для ЭКО или ИКСИ.

При выполнении этого метода используют центрифугирование эякулята в градиенте плотностей, содержащем коллоидные шарики, покрытые силаном, которые разделяют клетки по их плотности. Кроме того, подвижные сперматозоиды активно проникают через градиент и формируют небольшой осадок на дне пробирки. Метод простого двукратного градиента плотностей является наиболее применимым, обычно используют 40% (v/v) плотность как верхний слой и 80% (v/v) плотность как нижний. Обработка сперматозоидов с помощью градиента плотностей обычно позволяет получить фракцию высокоподвижных сперматозоидов, свободную от клеточного дебриса, лейкоцитов, округлых клеток и дегенерирующих половых клеток.

Ряд коммерческих продуктов доступен для обработки спермы в градиенте плотностей. Эти продукты следует использовать согласно рекомендациям производителя. Любое отклонение от рекомендаций производителя должно быть обосновано. Большинство градиентов концентрации среды содержит относительно высокие молекулярно-массовые компоненты, которые, по сути, снижают осмолярность, поэтому они обычно готовятся в среде, которая изомолярна с жидкостями женских половых путей.

5.5.1 Реагенты

1. Растворы BWW, Earle, Ham F-10 или HTF (Приложение 4, Разделы A4.1, A4.3, A4.4 и A4.6) с добавлением ЧСА или сыворотки, как описано ниже.
2. ЧСА, высокоочищенный, без контаминации вирусами, бактериями, прионами и эндотоксинами.
3. Обогащение ЧСА: к 50 мл среды добавить 300 мг ЧСА, 1,5 мг пирувата натрия, 0,18 мл лактата натрия (60% (v/v) очищенный концентрат) и 100 мг бикарбоната натрия.
4. Обогащение сывороткой: к 46 мл среды добавить 4 мл термоактивированной сыворотки пациента (56°С в течение 30–45 мин), 1,5 мг пирувата натрия, 0,18 мл лактата натрия (60% (v/v) очищенный концентрат) и 100 мг бикарбоната натрия.
5. Изотоническая среда градиента плотности: к 10 мл сконцентрированной в 10 раз культуральной среды (коммерчески доступна или см. Приложение 4, Разделы A 4.1, A4.3, A4.4 и A4.6) добавить 90 мл среды градиента плотности, 300 мг ЧСА, 3 мг пирувата натрия, 0,37 мл лактата натрия (60% (v/v) очищенный концентрат) и 200 мг бикарбоната натрия.
6. Градиент 80% (v/v): к 40 мл изотонической среды градиента добавить 10 мл обогащенной культуральной среды.
7. Градиент 40% (v/v): к 20 мл изотонической среды градиента добавить 30 мл обогащенной культуральной среды.

Важно: Хотя такие изотонические среды градиента плотности часто соотносятся как 100%, 80% и 40% (v/v), они бывают 90%, 72% и 36% (v/v).

5.5.2 Процедура

1. Подготовить среду с градиентом плотности в пробирке путем наслаивания 1 мл 40% (v/v) среды с градиентом плотности поверх 1 мл 80% (v/v) среды с градиентом плотности.
2. Хорошо перемешать образец (см. Бокс 2.3).
3. Поместить 1 мл спермы на приготовленную среду с градиентом плотности и центрифугировать при 300–400 g в течение 15–30 мин. Может быть использовано больше одной пробирки на образец, если это необходимо.
4. Удалить большую часть супернатанта.
5. Ресуспендировать осадок эякулята в 5 мл обогащенной среды аккуратным пипетированием (чтобы способствовать устранению контаминации среды с градиентом плотности) и центрифугировать при 200 g в течение 4–10 мин.
6. Повторить процедуру отмывки (пункты 4 и 5 выше).
7. Ресуспендировать финальный осадок в обогащенной среде аккуратным пипетированием так, чтобы можно было определить концентрацию и подвижность (см. Разделы 2.5 и 2.7).

5.6 Работа с ВИЧ-инфицированными образцами эякулята

Если в сперме присутствует вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусные РНК и провирусные ДНК могут находиться в свободном состоянии в семенной жидкости и на несперматогенных клетках. Так как рецепторы ВИЧ (CD4, CCR5, CXCR4) экспрессируются только на не сперматогенных клетках, комбинацию центрифугирования в градиенте плотности с последующим отмыванием swim up предлагают в качестве методики работы для предотвращения инфицирования незащищенного партнера (Gilling-Smith et al., 2006; Savasi et al., 2007). Эти процедуры были разработаны для того, чтобы отделить зараженные не сперматогенные клетки и семенную жидкость (в супернатанте градиента плотности) от незараженных подвижных сперматозоидов при swim up (из осадка после центрифугирования в градиенте плотности). Обработанные образцы могут быть протестированы с помощью метода обратной транскрипции полимеразной цепной реакции (RT-PCR) до использования, для процедур ВРТ применяют только неинфицированные ВИЧ образцы. До настоящего времени результаты были обнадряющими, было получено доказательство потери риска передачи ВИЧ-инфекции после обработки спермы.

Важно: Такой метод следует применять только в особых обстоятельствах, чтобы снизить риск перекрестной контаминации незараженных ВИЧ образцов (Gilling-Smith et al., 2005).

5.7 Обработка тестикулярных и эпидидимальных сперматозоидов

Сперматозоиды, полученные из тестикулярной ткани или эпидидимиса, требуют особой обработки.

Обычно показанием для аспирации клеток из эпидидимиса является obstructивная азооспермия, а не тестикулярное нарушение. Именно поэтому относительно большое число сперматозоидов может быть получено для терапевтических целей. Аспират эпидидимиса часто может быть получен с минимальной контаминацией эритроцитами и несперматогенными клетками, что делает выделение и отбор подвижных сперматозоидов относительно простым. Если получено большое число эпидидимальных сперматозоидов, центрифугирование в градиенте плотности является наиболее эффективным методом их обработки для последующего использования (см. Раздел 5.5). Если число полученных сперматозоидов низкое, может быть выполнена простая отмывка (см. Раздел 5.3). Тестикулярные сперматозоиды могут быть получены при открытой биопсии (с микродиссекцией или без нее), либо с помощью подкожной биопсии иглой. Тестикулярные образцы всегда контаминированы не сперматогенными клетками и большим количеством эритроцитов, что требует дополнительных шагов для выделения чистой фракции сперматозоидов. Для того, чтобы выделить из семявыносящих канальцев удлиненные (поздние) сперматиды («тестикулярные сперматозоиды»), необходимо применить ферментный или механический метод. Тестикулярные сперматозоиды готовят для проведения ИКСИ, так как их число мало, а подвижность низкая.

5.7.1 Ферментный метод

1. Инкубировать тестикулярную ткань с коллагеназой (например, 0,8 мг *Clostridium histolyticum* типа 1A на 1 мл среды) в течение 1,5–2 ч при 37°С, перемешивая каждые 30 мин.
2. Центрифугировать при 100 g в течение 10 мин, оценить осадок.

5.7.2 Механический метод

1. В чашке с культуральной средой измельчить тестикулярную ткань стеклянными покровными стеклами до получения однородной смеси.
2. Либо удалить клетки из семявыносящих канальцев с помощью тонких игл (прикрепленных к одноразовым инсулиновым шприцам), наклоняя их параллельно дну культуральной чашки.

5.7.3 Обработка суспензии сперматозоидов для интрацитоплазматической инъекции (ИКСИ)

1. Отмыть полученные образцы, добавив 1,5 мл культуральной среды.
2. Центрифугировать при 300 g в течение 8–10 мин.
3. Удалить супернатант и ресуспендировать осадок в 0,5 мл свежей культуральной среды.
4. Оценить подвижность и число сперматозоидов в осадке (некоторые образцы с низким числом сперматозоидов нужно ресуспендировать в меньшем объеме среды).
5. Поместить капли в 5–10 мкл культуральной среды на культуральную чашку.

6. Покрыть капли минеральным маслом (предварительно инкубированным в атмосфере CO₂).
7. Ввести 5–10 мкл суспензии сперматозоидов в капли культуральной среды.
8. Аккуратно аспирировать подвижные сперматозоиды, выявленные на поверхности между культуральной средой и маслом, иглой для ИКСИ.
9. Перенести их в каплю с раствором для замедления движения, например, поливинилпирролидоном (PVP) (7–10%) (100 г/л в культуральной среде).

5.8 Обработка спермы при ретроградной эякуляции

У некоторых мужчин при эякуляции сперма попадает в мочевого пузырь, что приводит к аспермии (полному отсутствию эякулята). Для подтверждения такой ситуации берут образец постэякуляционной мочи и проверяют ее на присутствие сперматозоидов. Если фармакологическое лечение невозможно или неуспешно, сперматозоиды можно выделить из мочи. Ощелачивание мочи с помощью, например, бикарбоната натрия будет увеличивать шанс, что любой сперматозоид, находящийся в моче, сохранит свою подвижность (Mahadevan et al., 1981).

В лаборатории мужчине следует выполнить следующие указания:

- Помочиться без полного опустошения мочевого пузыря.
- Получить эякулят путем мастурбации в специальный контейнер.
- Снова собрать мочу во второй сосуд, содержащий культуральную среду (для последующего ощелачивания мочи).

И эякулят, если он получен, и постэякуляционную мочу следует анализировать. Так как может быть получен большой объем мочи, часто необходимо концентрировать образец центрифугированием (500 g в течение 8 мин). Ретроградный образец, который уже был сконцентрирован, может быть эффективно обработан с использованием метода центрифугирования в градиенте плотности (см. Раздел 5.5).

5.9 Обработка спермы, полученной путем вспомогательной эякуляции

Сперма мужчин с нарушенной эякуляцией или тех, кто не смог получить эякулят, может быть собрана прямой вибрирующей стимуляцией пениса или ректально электростимуляцией простаты. Эякулят мужчин с повреждениями спинного мозга часто содержит высокую концентрацию сперматозоидов, сниженную подвижность и контаминацию красными и белыми клетками крови. Образцы, полученные при электроэякуляции, наиболее эффективно можно обрабатывать путем центрифугирования в градиенте плотности (см. Раздел 5.5). Вне зависимости от метода обработки, эти образцы эякулята часто содержат высокий процент неподвижных сперматозоидов.

ГЛАВА 6 Криоконсервация сперматозоидов

6.1 Введение

Криоконсервация сперматозоидов является важной частью работы многих лабораторий, анализирующих эякулят, в том числе и клиник вспомогательных репродуктивных технологий.

История криобиологии мужских половых клеток берет начало в 40-х годах прошлого столетия. Открытие, что глицерин защищает сперматозоиды от повреждений во время замораживания, привело к использованию сперматозоидов человека, хранимых при температуре -79°C на сухом льду (Polge et al., 1949; Bunge & Sherman, 1953; Bunge et al., 1954). Позднее был использован жидкий азот, а методика криоконсервации спермы быстро развивалась во многих странах с учреждением коммерческих или государственных банков спермы (Perloff et al., 1964; David et al., 1980; Clarke et al., 1997; Leibo et al., 2002).

В настоящее время используют множество протоколов криоконсервации с различными криопротекторами и протоколами замораживания. Выживание клеток после замораживания и оттаивания зависит по большей части от минимизации формирования внутриклеточных кристаллов льда. Этого возможно добиться при использовании подходящих криопротекторов и применения различной скорости охлаждения и оттаивания, которые минимизируют количество внутриклеточной воды, подверженной образованию льда (Sherman, 1990; Keel & Webster, 1993; Watson, 1995). Если сперматозоиды находятся значительное количество времени при температуре свыше -130°C (температурный переход стеклообразования), в частности при процедуре размораживания, может произойти рекристаллизация с увеличением повреждающих кристаллов льда внутри клетки.

Сперматозоиды человека допускают широкий диапазон скорости охлаждения и оттаивания. Они не слишком чувствительны к повреждениям, вызванным быстрым первоначальным охлаждением (холодовой шок), возможно, из-за высокой «текучести» клеточной мембраны, состоящей из ненасыщенных жирных кислот в липидном бислое (Clarke et al., 2003). Они могут быть также более устойчивы по сравнению с другими типами клеток к повреждениям при криоконсервации из-за их минимального содержания внутриклеточной воды (около 50%). Однако криоконсервация оказывает неблагоприятный эффект на функцию сперматозоидов человека, особенно на подвижность. В среднем, только около 50% подвижных сперматозоидов выживают после замораживания и оттаивания (Keel & Webster, 1993). Оптимизация процесса криоконсервации может минимизировать такие повреждения и повысить частоту (процент) наступления беременностей (Woods et al., 2004).

Частота наступления беременности при искусственной инсеминации спермой донора после ее криоконсервации часто связана с качеством эякулята после оттаивания, временем инсеминации и особенно с факторами пациентки, такими как возраст, предыдущие беременности при инсеминации донорской спермой, нарушения овуляции, заболевания матки и маточных труб (Le Lannou & Lansac, 1993). Если эякулят хранится в приемлемых условиях, не показано ухудшение качества сперматозоидов со временем; в настоящий момент рождены дети после оплодотворения спермой, хранимой более 28 лет (Feldschuh et al., 2005; Clarke et al., 2006).

Сперматозоиды могут быть криоконсервированы по многим причинам (см. Бокс 6.1). В некоторых случаях процедура криоконсервации может потребовать изменений (см. Раздел 6.2.2).

Бокс 6.1 Причины криоконсервации сперматозоидов

Сперма доноров

Эякулят здоровых доноров может храниться для последующего использования. Эти доноры могут быть найдены клиникой или банком спермы, тогда их сперматозоиды используются анонимно. В других случаях пациент может знать доноров.

Сперматозоиды доноров могут быть использованы для искусственной инсеминации, внутриматочной инсеминации, экстракорпорального оплодотворения или ИКСИ:

- для партнера мужчины с бесплодием и с отсутствием живых сперматозоидов или удлинённых сперматид, пригодных для ИКСИ, либо когда лечение безуспешно или слишком дорого;
- для предотвращения передачи наследственных заболеваний;
- для предотвращения фетальной гемолитической анемии при несовместимости групп крови;
- при привычном невынашивании беременности, когда инсеминация донорской спермой может привести к наступлению успешной беременности;
- для женщин, кто желает родить ребенка, но не имеет полового партнера.

Должны всегда проводиться генетические и инфекционные скрининги согласно местному и национальному законодательству.

Сохранение фертильности

Сперма может быть получена и сохранена до того, как мужчину подвергнут процедуре, которая может снизить его фертильность, например:

- вазэктомия (в случае будущего изменения брачной ситуации или желания родить ребенка);
- лечение цитотоксическими препаратами или лучевой терапией, которые, вероятно, надолго повредят сперматогенез (Meseguer et al., 2006; Schmidt et al., 2004);
- работа в опасных регионах, например, в вооруженных силах, для стран, где разрешено рождение детей после смерти отца.

Лечение бесплодия

Сперматозоиды могут быть сохранены для лечения супругов методами ВМИ, ЭКО или ИКСИ в случаях:

- тяжелой олигозооспермии или непостоянного присутствия подвижных сперматозоидов в эякуляте (как запасной вариант для ИКСИ) (Bourne et al., 1995);
- лечения бесплодия, которое может не сохраняться, например хирургическое лечение обструкции генитального тракта или гонадотропная терапия при гипоталамо-гипофизарном гипогонадизме;
- необходимости особенного сбора эякулята, например, вспомогательная эякуляция у мужчин с повреждениями спинного мозга, спер-

матозоиды при ретроградной эякуляции или хирургически полученные мужские половые клетки;

- мужчины, который не может собрать эякулят в день проведения процедуры ВРТ.

Минимизация передачи инфекционных заболеваний

Для мужчин, страдающих ВИЧ и проходящих антиретровирусную терапию, образцы с не обнаруженными вирусными частицами могут быть криоконсервированы для ВМИ, ЭКО или ИКСИ, чтобы попытаться зачать ребенка, при этом снизить риск передачи ВИЧ женщине.

Важно 1: Для сохранения фертильности и лечения бесплодия при нормальных показателях спермы следует хранить количество образцов, достаточное для 10 и более инсеминаций, чтобы обеспечить хороший шанс наступления беременности. При аномальных показателях эякулята целесообразен множественный пул образцов для циклов ВРТ.

Важно 2: Так как только один сперматозоид необходим для оплодотворения ооцита методом ИКСИ, даст результат криоконсервация всех живых сперматозоидов.

Важно 3: Сохранение собранного эякулята до проведения процедуры стерилизации часто имеет существенное психологическое значение, так как оно дает мужчине надежду в будущем стать отцом. Для мужчин, проходящих терапию алкилирующими препаратами или лучевую терапию, сперма должна быть собрана до начала терапии, так как при проведении последней существует риск индукции мутаций в сперматозоидах. Всем мужчинам, подвергаемым химио- и лучевой терапии, включая юношей (Kamischke et al., 2004), должна быть предложена возможность сохранения сперматозоидов.

Криоконсервация и последующее хранение спермы является достаточно сложным процессом, который накладывает особую ответственность и потенциальные обязанности на лабораторный персонал. Рекомендована всесторонняя оценка риска (см. Бокс 6.2).

Бокс 6.2 Оценка риска криоконсервации и хранения спермы человека

При оценке риска, связанного с криоконсервацией и хранением спермы, следующие вопросы должны быть рассмотрены.

Ресурсы

- физическая безопасность сосудов для хранения, образцов и криохранилища для снижения риска потери от воровства или огня, а также повреждения соломин, ампул и криовиал и от снабжения жидким азотом.
- Исправность оборудования, предполагаемого для использования.
- Система хранения и переливания азота.

Безопасность и защита персонала

- Персональные средства защиты.
- Система оповещения при обнаружении низких уровней азота и кислорода.

Риск перекрестной контаминации

Для снижения риска перекрестной контаминации инфекционными агентами между образцами при хранении (например, ВИЧ, гепатиты В, С через сосуд для криоконсервации) обдумывают:

- тип контейнера для хранения: виалы или соломины и метод запечатывания соломин (термический или полимерный);
- природу хранения: жидкий азот или его пары;
- протокол и метод хранения образцов с высоким риском (образцы с обнаруженными или с предполагаемыми вирусами).

Безопасность замороженных образцов

- Разделение образцов и их хранение в разных местах для снижения потери всех образцов.
- Двойной контроль идентификации образцов на каждом этапе.
- Использование стойкой маркировки и идентификационного кодирования.
- Проведение процедур регулярного аудита использования материала и образцов, остающихся на хранении.

Источники: Tedder et al., 1995; Mortimer, 2004; Gilling-Smith et al., 2005; Tomlinson, 2005.

Важно 1: Хранение образцов в парах, а не в жидком азоте само по себе может снижать риск перекрестной контаминации. Однако большой температурный градиент может существовать в сосуде для хранения в зависимости от его формы, размера образцов и типа используемых контейнеров для замораживания спермы. В чрезвычайных случаях температура менее -100°C не может быть достигнута (Tomlinson, 2005). Если используют хранение в парах жидкого азота, необходимо убедиться, что температура образцов не превышает -130°C (температура трансформации в стеклообразное состояние), так как это может привести к повреждению сперматозоидов (см. Clarke, 1999).

Важно 2: Для хранения в жидком азоте доступны безопасные соломины, сделанные из теплопроводного иономера. Они не протекают, защищают от бактериального и вирусного проникновения и механически устойчивы при температуре -196°C (Mortimer, 2004; Gilling-Smith et al., 2005; Tomlinson, 2005).

6.2 Протоколы криоконсервации спермы

Доступны некоторые протоколы работы с криохранилищами и банками спермы (Mortimer, 2004; Wolf, 1995). Коммерчески доступны несколько криопротекторов. Ниже описаны детали использования стандартного криопротектора, глицерин-желток яйца-цитрат (glycerol-egg-yolk-citrate, GEYC), а также заморозки спермы с помощью программируемого замораживателя и криоконсервации в парах азота.

6.2.1 Стандартная процедура

6.2.1.1 Подготовка криопротектора GEYS

1. К 65 мл стерильной дистиллированной воды добавьте 1,5 г глюкозы и 1,3 г трехосновного дегидрат цитрата натрия.
2. Добавьте 15 мл глицерина и тщательно перемешайте.
3. Добавьте 1,3 г глицина. После его растворения профильтруйте полученный раствор в фильтре с диаметром пор 0,45 мкм.
4. Добавьте 20 мл свежего яичного желтка (предпочтительно полученного из специальных непатогенных яиц): вымойте яйцо и удалите оболочку. Проколите мембрану, окружающую яйцо, и наберите содержимое в шприц (приблизительно 10 мл желтка можно получить из одного яйца).
5. Поместите всю суспензию на водяную баню при 56° С на 40 мин с медленным вращением.
6. Проверьте pH раствора. Если он выходит за диапазон 6,8–7,2, удалите раствор и приготовьте новый в случае, если были добавлены некорректные ингредиенты или неправильное количество компонент.
7. На этой стадии может быть проведено бактериологическое культивирование с целью тестирования стерильности.
8. На этой стадии также может быть проведено тестирование на токсичность для сперматозоидов.
9. Разлейте раствор в стерильную посуду по 2 мл и храните при температуре –70° С.
10. Используйте в течение 3 мес.

Криопротекторы, подобные GEYS, коммерчески доступны.

6.2.1.2 Добавление криопротекторов в эякулят

1. Разморозьте криопротектор, оттаивая его при комнатной температуре, и перемешайте. Начальная температура оттаивания 37° С наиболее пригодна.
2. Высокие концентрации глицерина могут повредить сперматозоиды. Именно поэтому для сохранения их жизнеспособности необходимо соблюдать предельную аккуратность при добавлении и смешивании криопротектора со спермой.
3. Добавьте один объем GEYS к двум объемам спермы, либо по капельно с вращением пробирки, либо с помощью аккуратного пипетирования вверх вниз, либо в пять добавлений с медленным перемешиванием приблизительно в течение 10 мин при комнатной температуре.
4. После добавления GEYS инкубируйте смесь при 30–35° С в течение 5 мин.

6.2.1.3 Заполнение соломин эякулятом

1. Пластиковые соломины по 0,5 мл наиболее популярны из-за их теплопроводных свойств и простоты хранения. Пластиковые виалы могут быть использованы для хранения больших объемов спермы.

2. Аспирируйте смесь спермы с криопротектором GEYC в 0,5 мл пластиковую соломину или заполните криовиалу. Соломины могут быть наполнены с помощью специального вакуумного прибора либо адаптора, подходящего по размеру концу соломины.

6.2.1.4 Запечатывание соломин с эякулятом

Соломины со слоем порошка из поливинила между хлопковыми прокладками в верхней части автоматически запечатываются при контакте спермы, которая полимеризует порошок.

1. Оставьте воздушное пространство в 1 см от конца пробки со стороны наполнения соломины.
2. Закройте этот конец с помощью погружения в стерильный поливиниловый запечатывающий порошок и поместите соломины в воду на глубину 1 см.
3. Термозапечатывание может быть более приемлемо, так как порошок может пропускать инфекционные частицы.
4. Альтернативно, образцы могут храниться в пластиковых виалах или ампулах. Их следует заполнять не более чем на 90%.
5. Вытрите внешнюю сторону контейнера насухо, а затем стерилизуйте 70% (v/v) спиртом или другим дезинфицирующим раствором.

6.2.1.5 Охлаждение и заморозка эякулята с помощью программируемого замораживателя

Программируемые замораживатели необходимы для контроля поступления паров жидкого азота в камеру для криоконсервации.

1. Поместите соломины или криовиалы в программируемый замораживатель и следуйте инструкции производителя, чтобы активировать программу.
2. Общепринятая программа: охладить соломины с этапа 1,5°С в мин от 20°С до -6°С, затем 6°С в мин до -100°С. Это займет около 40 мин. Машина затем будет удерживать температуру в охлаждающей камере -100°С в течение 30 мин, чтобы предусмотреть паузы для переноса соломин в жидкий азот.
3. Можно использовать другие, более сложные процедуры в зависимости от опыта сотрудников лаборатории (Pérez-Sánchez et al., 1994).

6.2.1.6 Охлаждение и замораживание эякулята вручную

Методы «ручной» криоконсервации менее управляемы по сравнению с использованием программируемого замораживателя, но также дают приемлемые результаты. Существует множество вариантов этой процедуры.

1. Поместите соломины в холодильник (-20°С) на 30 мин, затем на сухой лед (-79°С) на 30 мин до помещения в жидкий азот (-196°С).
2. Соломины могут быть перемещены из замораживателя с температурой -20°С в другой замораживатель с температурой -70°С, либо в

сосуд со смесью паров жидкого азота и воздуха с температурой от -80°C до -100°C на 10–15 мин до помещения соломин в жидкий азот. Их также можно поместить на штатив, расположенный на 10–20 см выше уровня жидкого азота в контейнере, и удерживать в течение 1 ч для создания температурного градиента над жидким азотом.

6.2.1.7 Хранение замороженной спермы

1. Поместите замороженные соломины в пластиковые тубы для хранения (мини-бокалы) и распределите их в больших бокалах для хранения.
2. Поместите криовиалы в металлические держатели или боксы для хранения, которые подходят по размеру, для предпочтительного использования в парах жидкого азота, так как крышки криовиал не обеспечивают полной герметичности.
3. Храните бокалы с соломинами или держатели в сосуде с жидким азотом (сосуд Дюара).

6.2.1.8 Транспортировка замороженной спермы

1. Замороженные образцы спермы могут быть транспортированы в коммерчески доступных контейнерах для перевозки, охлажденных до температуры жидкого азота. В зависимости от размера контейнера для перевозки соответственно низкая температура может быть поддержана в течение от нескольких дней до нескольких недель из-за испарения жидкого азота.

Важно: Убедитесь, что местное, национальное и международное законодательство по транспортировке жидкого азота и биологического материала человека соблюдено.

6.2.1.9 Разморозка замороженной спермы

1. До использования возьмите необходимое количество соломин из жидкого азота или из паров азота и поместите их на тканевую салфетку либо в штатив для достижения ими комнатной температуры (это займет около 6 мин). Криовиалы требуют большего времени для оттаивания (10–20 мин).
2. После 10 мин отрежьте конец соломины стерильными ножницами и поместите ее в прибор для инсеминации (для терапевтического использования) или выдавите содержимое для оценки подвижности сперматозоидов после заморозки и оттаивания (для проверки процесса замораживания).
3. Более быстрое оттаивание может быть более успешным при быстрой заморозке спермы (Verheyen et al., 1993).
4. Удалите криопротектор соответствующим раствором, добавляемым по капельно для избежания чрезмерного осмотического стресса (Gao et al., 1995) и повышения частоты наступления беременности.

6.2.2 Модифицированный протокол замораживания для образцов с олигозооспермией и для хирургически полученных сперматозоидов

- Сперма, которая содержит мало подвижных сперматозоидов или сперматозоиды получены из генитального тракта, могут быть сохранены для последующего использования при ИКСИ.
- Если необходимо, центрифугируйте сперму при 1500g в течение 10 мин для концентрирования сперматозоидов в минимальном объеме около 0,4 мл. Добавьте GEYS и продолжите процедуру, как описано выше.
- Эпидидимальные, тестикулярные и иные суспензии сперматозоидов, обработанные в лаборатории методом swim-up или центрифугированием в градиенте плотности (см. Разделы 5.4 и 5.5) и ресуспендированные в культуральной среде для сперматозоидов с HEPES-буфером и человеческим сывороточным альбумином (HSA) 4 мг/мл, могут быть криоконсервированы с помощью криопротектора Тироде (TGG) или коммерчески доступного криопротектора, содержащего человеческий альбумин.

6.2.2.1 Модифицированный криопротектор (TGG)

1. К 40 мл стерильного раствора Тироде (см. Приложение 4, Раздел A4.9) добавьте 5 мл стерильного рабочего раствора сывороточного альбумина человека (100 мг/мл), 0,9 г глюкозы и 5 мл глицерина. Профильтруйте раствор через фильтр с порами 0,45 мкм.
2. Храните в 2 мл аликвотах при температуре -70°C .

6.2.2.2 Процедура

1. Если объем образца больше 2,0 мл, при этом присутствует небольшое количество подвижных сперматозоидов, центрифугируйте его при 1500 g в течение 5 мин при комнатной температуре.
2. Аспирируйте супернатант, оставив 1,0 мл, ресуспендируйте осадок сперматозоидов в нем. Определите процент подвижных сперматозоидов (PR+NP); если присутствует очень малое количество подвижных сперматозоидов, оцените число подвижных клеток под каждым покровным стеклом в расчетной камере.
3. Получите оттаивание 2 мл криопротектора TGG.
4. Постепенно добавляйте один объем TGG к одному объему окончательного препарата спермы, перемешивая.
5. Оформите соломины или криовials, как описано выше. Если соломины не полные, накройте мини-бокал во избежание всплытия соломины после заморозки.

6.2.3 Маркировка соломин и ведение записей

Ясная кодирующая система маркировки соломин или виал очень важна. Используйте уникальный код во всех лабораторных листах и в компьютерной базе данных для сохранения анонимности доноров. Держите отдельно и в секрете ключ от кода идентификации доноров. Существует множество кодирующих систем; важным требованием является уникальный код для каждого донора или пациента. Следующие кодирующие системы хорошо себя зарекомендовали.

- Каждому новому анонимному донору присваивается двухбуквенный код (AA, AB, AC ... BA ... и т. д., заканчивая ZZ, после чего необходим новый метод кодирования).
- Трехбуквенная система кодирования используется для пациентов и не анонимных доноров: AAA, AAB, и т. д.
- Каждый образец от донора маркируется номером его персонального кода. Например, восьмая донация от донора BT маркируется BT-8.
- Буквенный код и номер образца следует писать на каждой соломинке или виале, используя черный несмываемый маркер. Либо можно использовать печатную маркировку, специально разработанную для жидкого азота.
- Мини-бокалы, в которых хранятся соломинки, также должны содержать маркировочный стикер с кодом и номером хранимого образца.
- Цветовое кодирование бокалов, мини-бокалов, соломинок и запечатывающего порошка также полезно для быстрой идентификации.
- По мере использования хранящихся сперматозоидов расход следует учитывать в соответствующей базе данных.

Важно: Все процедуры, включающие идентификацию образцов эякулята донора или пациента, включая получение образцов, подготовку и маркировку соломинок, помещение в сосуды и оттаивание соломинок для использования или уничтожения, следует подвергать двойной проверке двумя работниками и как доказательство такой проверки записывать в лабораторный журнал. В идеале лаборанту следует работать только с одним образцом спермы в каждый момент времени.

ЧАСТЬ 3

Обеспечение качества

ГЛАВА 7 Обеспечение и контроль качества

7.1 Контроль качества в андрологической лаборатории

Андрологические лаборатории должны выдавать надежные результаты для соответствующих диагностических целей и для охраны здоровья. Так как семиологический анализ — сложная диагностическая процедура, его достаточно трудно стандартизировать. Контроль качества (КК) важен для обнаружения и исправления систематических ошибок и обеспечения высокой надежности получаемых данных. Большое различие между оценками концентрации сперматозоидов и их морфологии в различных лабораториях (Neuwinger et al., 1990; Matson, 1995; Cooper et al., 1999, 2002) требует совершенствования программ контроля качества и стандартизации.

Каждая лаборатория, не зависимо от ее размеров, должна проводить программы обеспечения качества на основании стандартизованных методов и процедур для обеспечения точности и аккуратности своих измерений (De Jonge, 2000; Mortimer & Mortimer, 2005). В некоторых странах программы обеспечения качества требуются согласно законодательству, в других — для аккредитации систем страхования здоровья. В определенных ситуациях можно не проводить полностью выполнение всех процедур, описанных здесь. Несмотря на это, фундаментальные параметры качества эякулята — концентрация, морфология и подвижность — всегда следует проверять с помощью внутреннего контроля качества и, если возможно, с помощью внешнего контроля качества.

На тему контроля качества написано несколько руководств (например, Wheeler & Chambers, 1992; Wheeler, 1993) и публикаций, которые дают более полное описание процесса КК в андрологической лаборатории (например, Cembrowski & Carey, 1989; Carey & Lloyd, 1995; Westgard, 2002). Контроль качества, осуществляемый в рамках одной лаборатории, называется внутренним контролем качества (внутренний КК) (см. Раздел 7.6). Под внешним контролем качества (внешний КК) понимают оценку результатов, полученных в нескольких лабораториях при проведении анализа одного и того же образца (см. Раздел 7.11).

7.2 Природа ошибок при анализе эякулята

Управление процедурами КК требует понимания источника и величины возникающих ошибок. При любых расчетах возможна определенная ошибка, величина которой описывается доверительным интервалом с верхними и нижними границами. При точных расчетах пределы доверительного интервала находятся близко друг к другу, а результат отличается от истинного значения на минимальную величину. Существует два вида ошибок: случайные и систематические. Случайные ошибки, связанные с недостаточной точностью расчетов, возникают при чтении данных или работе с образцами, их можно оценить при помощи повторных измерений, проводимых тем же исследователем на том же оборудовании. Систематические ошибки более серьезны, так как связаны с факторами, приводящими к смещению результатов только в одну сторону, из-за чего

возникающие расхождения не могут быть обнаружены повторными измерениями.

Даже когда образец эякулята хорошо перемешан, существует случайное распределение сперматозоидов в сперме или на фиксированном препарате или в среде, поэтому происходят расхождения в результатах семиологического анализа. Оценка концентрации сперматозоидов, подвижности, жизнеспособности и морфологии включает подсчет ограниченного числа сперматозоидов, которые, как предполагают, представляют репрезентативную выборку всего образца. Вариабельность, возникающая вследствие отбора ограниченного объема эякулята при оценке концентрации сперматозоидов, либо ограниченного числа сперматозоидов при оценке их подвижности, морфологии и жизнеспособности, является случайной ошибкой, обычно рассматриваемой как статистическая ошибка выборки. Некоторые термины описаны в Боксе 7.1. Другие ошибки могут возникать при перемешивании образца или забора аликвоты; их можно минимизировать, совершенствуя методы анализа (см. Раздел 7.13).

Цель контроля качества при выполнении рутинного анализа эякулята заключается в отслеживании границ как случайных, так и систематических ошибок и снижении их, где возможно. Все эти ошибки необходимо минимизировать, чтобы результаты были достоверны и были использованы врачами и исследователями.

7.3 Минимизация статистической ошибки выборки

Подсчет большего числа сперматозоидов приведет к снижению ошибки выборки (см. Табл. 2.2 и Боксы 2.5 и 2.7), однако необходимо обеспечить баланс между стремлением к статистической точности, требующей дополнительного времени, и возможной потерей точности рутинной работы лаборанта вследствие утомления. Использование 95% доверительного интервала для оценки приемлемости повторных измерений означает, что для порядка 5% образцов различие больше величины «1,96 × стандартная ошибка» возникает в результате изменения только вариации, и повторный подсчет излишен. Такая дополнительная работа может быть приемлема; альтернативно, более широкие границы (2,6 × или 3 × стандартная ошибка) могут быть выбраны для снижения частоты этого события (приблизительно на 1% и 0,2% , соответственно).

Бокс 7.1 Некоторые термины программ обеспечения и контроля качества

Точность	Максимальное совпадение между результатами теста и истинным значением.
Оцениваемое значение	Оценка истинного значения часто выведена из средних результатов нескольких лабораторий (целевое значение, консенсусное значение, доверительное значение).
Смещение	Отклонение результатов теста от оцениваемого значения. Воспроизводимые неточности, которые находятся постоянно в

	одном направлении (систематическая ошибка).
Биноминальное распределение	Теоретическое распределение, используемое при моделировании событий, принимающих только два значения, например, подвижный/неподвижный, живой/мертвый.
График Бланта-Альтмана	График различий между сериями парных измерений относительно их среднего значения.
Общая причина отклонения	Источник естественного отклонения, который влияет на все отдельные значения изучаемого процесса.
95% доверительный интервал	Интервал, рассчитанный, исходя из наблюдаемых данных, который включает истинное значение с 95% вероятностью ($\text{среднее} \pm 1,96 \times SE$ или $N \pm 1,96 \times \sqrt{N}$ для дискретных величин).
Консенсусное значение	См. оцениваемое значение.
Доверительное значение	См. оцениваемое значение.
Контрольный график	График, показывающий серию отдельных измерений во времени вместе с центральной линией и контрольными границами.
Контрольные границы	Максимально разрешенное отклонение процесса, вызванное только общей причиной отклонения. Отклонение от контрольной границы показывает, что на процесс влияют дополнительные причины.
Сдвиг значений	Последовательные небольшие изменения значений, приводящие к изменению точности во времени.
Внешний контроль качества	Тесты по контролю качества, разрабатываемые внешними организациями; позволяют сравнить различные лаборатории по нескольким процедурам. Полезны для обнаружения систематических отличий и оценки точности.
Хорошая лабораторная практика (good laboratory practice, GLP)	Набор принципов, согласно которым работу лаборатории планируют, выполняют, контролируют, записывают, выдают как результат и архивируют.
Контролируемый процесс	Говорят, что процесс контролируем, если все значения находятся внутри ожидаемых контрольных границ.
Внутренний контроль качества	Тесты контроля качества, измеряющие вариабельность процедур, которые проводят

	внутри лаборатории. Такие тесты оценивают точность рутинных ежедневных операций. Полезны для обнаружения случайных вариаций (оценка точности).
ISO	Международная организация стандартизации (International Organization for Standardization). Основная часть документации — международные стандарты, в том числе в области лабораторного качества.
Коммерческие образцы для КК	Коммерчески доступные образцы, созданные и проанализированные (оцененные) согласно инструкции производителя
Процесс вне контроля	Процесс находится вне контроля, если измеренные величины выходят за ожидаемые контрольные границы или находятся внутри контрольных границ, но недостоверны.
Тренд в значениях	Процесс выброса данных вне контрольных, которые должны быть оценены.
PDCA	Модель непрерывного улучшения процессов (планируй (plan), делай (do), проверяй (check), действуй (act)) (цикл Шухарта)
Распределение Пуассона	Теоретическое распределение, используемое при моделировании расчета.
Оценка точности	Максимальная близость (подобие) между повторными измерениями. В общем случае выражается как неточность (отклонение от истинного значения). Измерение точности влияет на смещение (см. также ошибка выборки).
Точность ошибки	См. Ошибка выборки.
Случайная ошибка	См. Ошибка выборки.
График S	Контрольный график стандартных отклонений измеренных значений во времени. Используется для мониторинга согласованности процесса и точности измерений.
Ошибка выборки	Ошибка, связанная с подсчетом ограниченного количества сперматозоидов; обратно пропорциональна квадратному корню подсчитанного числа. Ошибка выборки (%SE) равна стандартной ошибке подсчитанного числа (\sqrt{N}), выраженной в процентах ($100 \times (\sqrt{N}/N)$ (случайная ошибка, ошибка точности, статистическая ошибка выборки).
Цикл Шухарта	См. PDCA

Особая причина отклонения	Серьезный, переменчивый и непредсказуемый источник отклонения, влияет только на некоторые отдельные значения изучаемого процесса (случайное отклонение).
Протокол стандартных лабораторных процедур	Набор инструкций о том, как следует проводить процессы и методы
Статистическая ошибка выборки	См. Ошибка выборки
Систематическая ошибка	См. Смещение
Целевое значение	См. Оцениваемое значение
Вариации	Разница между отдельными результатами процесса. Причина вариации (ошибка) может быть общей или частной.
График \bar{X}_{bar}	Контрольный график, показывающий средние значения измеренных величин во времени. Используется для мониторинга вариабельности и обнаружения отклонений от заданных значений (оцениваемая точность).
График Юдена	График значений анализа одного образца, нанесенных напротив значений другого образца.

7.4 Программа обеспечения качества

Наилучший способ достигнуть приемлемых результатов — разработать и применять последовательную программу обеспечения качества (ОК). Программа ОК отслеживает и оценивает на регулярной основе качество и правильность данных и услуги, которые предоставляет лаборатория. Управление, администрирование, статистический анализ и профилактические и корректирующие действия составляют основу плана ОК. Непрерывное отслеживание не только обнаруживает и корректирует проблемы, но также помогает предупредить их. Управление, ведение, статистический анализ и действия по предотвращению и корректировке составляют основу плана обеспечения качества. Непрерывный мониторинг не только обнаруживает и исправляет недостатки, но также помогает предотвратить их.

Программа обеспечения качества должна быть описана в руководстве по качеству, содержащем прописи стандартных лабораторных процедур и детальные инструкции по различным процессам и методам, используемым в лаборатории. Связанные с руководством документы — ряд форм и бланков, таких как направления, лабораторные рабочие листы и информационные листки для пациентов и клиницистов. Руководство по качеству описывает организационную структуру лаборатории с перечнем необходимых требований к различным позициям (рабочее описание), а также расписание встреч между тестируемым персоналом и супервизорами, план непрерывного обучения, развития и тренировки персонала.

7.5 Прописи стандартных лабораторных процедур

Прописям стандартных лабораторных процедур необходимо неукоснительно следовать всем сотрудникам лаборатории. Они также полезны для тренировки и важны для не рутинных процедур и для выявления проблем при получении неудовлетворительных результатов.

Эти протоколы содержат важные комментарии, процедуры получения информации о пациенте, протоколы лечения пациентов, выполнение анализов, отчеты о результатах, методики обучения новых сотрудников лаборатории, тестирование и контроль оборудования, использование контрольных графиков и процедур, которым необходимо следовать, если значения на этих графиках указывают на проблему. Прописи (SOP) должны содержать процедуры проверки всего оборудования на корректность работы, включая рутинные операции проверки, расписание и порядок калибровки, документацию о состоянии научного оборудования, такого как микроскопы, центрифуги, пипетки, весы, замораживатели, холодильники и средства скорой помощи (например, растворы для промывания глаз и душ). Основной способ — хранить отдельные тетради для каждого оборудования, в которых следует записывать информацию об установке и калибровке. Эти записи полезны, когда лабораторные процедуры дают некорректные результаты.

7.6 Внутренний контроль качества

Внутренний контроль качества (IQGKK) проверяет точность и указывает на результаты, выходящие за рамки контрольных значений, когда анализ выполняют ошибочно. Используемая процедура КК зависит от метода, который необходимо проконтролировать, так как различные методы имеют чувствительность к различным ошибкам. Методы, которые включают разведение, пипетирование и повторное использование камер, требуют регулярного тестирования, при этом оценка фиксированных препаратов на предметных стеклах или анализ видеоизображения можно тестировать менее часто, так как в них содержится меньше этапов (моментов), где может произойти ошибка.

Практический способ осуществить внутренний КК — включить материалы внутреннего КК в рутинную работу лаборатории и мониторировать результаты этих материалов с использованием графиков контроля качества. Внутренний КК становится частью рутинной лабораторной работы и проводится согласно местным или региональным стандартам. Важно, чтобы образцы для КК анализировали как часть рутинной работы лаборатории, и не выделяли из процесса, что обеспечивает более точный расчет и получение более объективных данных. Типы материала для внутреннего КК, используемого для мониторинга как одного сотрудника, так и между несколькими сотрудниками, могут быть как коммерческими, так и приготовленными в лаборатории; каждый подход имеет свои преимущества и недостатки.

7.6.1 Покупка образцов для контроля качества

Коммерчески доступные образцы для внутреннего КК дают информацию о среднем значении и известном разбросе вариаций, установленном для

данного образца. Преимущество такого подхода заключается в том, что как правильность, так и точность можно рассчитать. Вариации в результатах семиологического анализа в лаборатории можно сравнить с вариациями представленного образца. С помощью таких образцов лаборатории следует построить свои собственные контрольные графики для оценки точности и следует использовать рекомендованный производителем диапазон для оценки истинных значений (Westgard, 2002). К недостаткам коммерческих образцов следует отнести их стоимость и тот факт, что они не являются универсальными. Необходимо записывать, как производитель получил целевые значения (множественная оценка, анализ с помощью компьютера, консенсусные значения, усеченные средние и т. д.).

7.6.2 Образцы, приготовленные в лаборатории

Преимуществом образцов, приготовленных в лаборатории, является их низкая стоимость и тот факт, что препараты можно готовить специально для нужд лаборатории. Множество образцов, покрывающих широкий диапазон значений, можно приготовить и хранить в течение длительного времени. К недостаткам можно отнести то, что целевое значение остается неизвестным. Рекомендуется, а иногда и требуется, чтобы существовал контрольный образец для оценки среднего значения диапазона (например, концентрации сперматозоидов 50 млн/мл), а также для критического диапазона значений (например, концентрации сперматозоидов < 15 млн/мл)

7.6.3 Хранящиеся образцы эякулята для контроля качества (приготовленные промышленно или в лаборатории)

Хранящиеся образцы можно использовать для программ внутреннего КК для оценки концентрации сперматозоидов, подвижности, морфологии и жизнеспособности. Они имеют преимущества в том, что их целевое значение известно (для коммерческих образцов), или подсчитано (в программах внешнего КК), или оценено множественными подсчетами (лабораторный материал), поэтому при повторных измерениях можно определить систематические ошибки.

7.6.3.1 Концентрация сперматозоидов

Образцы эякулята с различной концентрацией сперматозоидов можно разводить и хранить. Несколько образцов можно объединить для достижения определенной концентрации или для большего объема суспензии, но при этом может происходить агглютинация сперматозоидов. См. Приложение 7, Раздел А7.б. с инструкциями по приготовлению и хранению суспензии сперматозоидов без агглютинации для внутреннего КК по оценке концентрации.

7.6.3.2 Морфология и жизнеспособность сперматозоидов

Для оценки морфологии можно использовать препараты, высушенные на воздухе, фиксированные мазки на предметных стеклах (см. Раздел 2.13.2.1) или фиксированные и окрашенные мазки (см. Раздел 2.14), для оценки жизнеспособности — мазки, окрашенные эозин-нигрозином (см. Раздел 2.6.1). Мазки следует отбирать из рутинных образцов лабо-

ратории, зашифровав идентификационный номер. Образцы следует готовить из эякулята хорошего, среднего и плохого качества. Предметные стекла можно использовать повторно; если они начинают портиться, следует приготовить новые препараты. Лучше использовать несколько предметных стекол для оценки возможностей лаборантов, так как иногда препараты становятся легко узнаваемыми, что приводит к неправильным результатам.

См. Приложение 7, Раздел А7.7 о том, как приготовить препараты для КК для оценки морфологии сперматозоидов. Если предметные стекла приготовлены и хранятся должным образом, они остаются стабильными в течение нескольких месяцев и даже лет. Некоторые препараты можно заменить или оставить при переходе с одного набора препаратов для КК на другой.

7.6.3.3 Подвижность сперматозоидов

Для КК можно использовать образцы, записанные на кассеты, CD или DVD в клинике или из набора для внешнего КК или приготовить специально. Видеозапись должна осуществляться при том же увеличении, что используют в рутинной практике лаборатории. Использование видеокамеры и монитора в ежедневной рутинной практике при том же увеличении и контрастности, что и записанный видеофрагмент, увеличивает состоятельность видеофрагмента для КК.

См. Приложение 7, Раздел А7.5, о том, как создать видеозапись для КК измерений подвижности сперматозоидов.

7.6.4 Нативные образцы эякулята для контроля качества (приготовленные в лаборатории)

Простой метод проведения внутреннего КК — для одного или нескольких лаборантов провести повторный анализ отдельных аликвот образца эякулята. Повторные оценки следует выполнять тем же способом, что и при обычном анализе эякулята. Такой способ проведения КК может быть применен для оценки концентрации сперматозоидов, подвижности, морфологии и жизнеспособности. Субъективная природа оценки агглютинации и агрегации, а также вариабельность теста на смешанную антиглобулиновую реакцию (Bohring & Krause, 1999) вместе с необходимостью иметь живые клетки и положительный контроль, затрудняет проведение для данных анализов процедур КК.

Внутренний КК при оценке подвижности сперматозоидов на нативных препаратах представляет особую проблему, так как подвижность может со временем снижаться, и поэтому должна быть оценена в первую очередь — примерно в одно и то же время — всеми лаборантами.

Препараты на предметных стеклах вместе с покровными для оценки подвижности стабильны только несколько минут, поэтому можно использовать камеры с фиксированной глубиной, которые стабильны в течение 30 мин. Использование шунтового микроскопа или видеокамеры, соединенной с монитором, позволяет нескольким лаборантам оценить одно и то же поле препарата в один и тот же промежуток времени. Ацетатную сетку можно поместить на монитор для создания подобия окулярной сетки во время анализа подвижности (см.

Приложение 7, Раздел А7.5).

Лаборатории, использующие система CASA, должны придерживаться руководств производителя для проведения контроля качества. Часто они включают повторную оценку записанных изображений подвижных сперматозоидов.

7.7 Статистические процедуры оценки систематических различий результатов, полученных одним и тем же лаборантом и разными лаборантами

Построение и интерпретация контрольных графиков — основная часть обеспечения качества работы в лаборатории. Выбор системы КК зависит от природы проблемы и доступного материала.

7.7.1 График \bar{X}_{bar}

График \bar{X}_{bar} разработан главным образом для обнаружения результатов, которые сильно отличаются от целевого значения, или при слишком большой вариации. Систематические ошибки можно обнаружить путем последовательных измерений одного и того же образца. Повторные измерения проводят на препарате, а средние значения наносят на график напротив времени. Хранящиеся образцы зависят от известных истинных или целевых значений, которые предоставляет производитель (коммерческие препараты), программы внешнего КК или самостоятельная многократная оценка.

Комментарий: График \bar{X}_{bar} менее чувствителен, чем график S в обнаружении того, являются ли результаты анализа лаборантов высоко вариабельными (см. Раздел 7.7.2). Для проверки вариабельности диапазон значений каждого образца КК можно контролировать с помощью графика S аналогично графику \bar{X}_{bar} с установлением предупредительных и действительных границ.

7.7.1.1 Расчет контрольных границ для графика \bar{X}_{bar}

Последовательно измеряют серии образцов для КК одной и той же серии препаратов для внутреннего КК. После анализа первых 10 образцов вычисляют контрольные границы для каждого лаборанта. Они определяют диапазон повторных измерений образца. После каждого 10 образца оценивают среднее значение и стандартное отклонение, а контрольные границы пересчитывают, используя новые данные для \bar{X}_{bar} и S_{bar} при условии, что нет проблем с КК. До того, как кончатся образцы для КК новый объем препаратов следует приготовить и проанализировать вместе с оставшимися и установить новые контрольные границы. Коэффициенты, используемые для расчета контрольных границ, даны в Табл. 7.1, примеры с решениями показаны в Боксе 7.2 и 7.3.

Таблица 7.1 Коэффициенты контрольных пределов для графиков \bar{X}_{bar} и S на основе среднего стандартного отклонения (S_{bar})

Число лаборантов (n)	Стандартное отклонение (C_n)	Контрольные пределы для \bar{X}_{bar}		Контрольные пределы для S_{bar}			
		Предупредительные (A_2)	Действительные (A_3)	Нижние действительные ($S_{0,999}$)	Нижние предупредительные ($S_{0,975}$)	Верхние предупредительные ($S_{0,025}$)	Верхние действительные ($S_{0,001}$)
2	1,253	1,772	2,659	0,002	0,039	2,809	4,124
3	1,128	1,303	1,954	0,036	0,180	2,167	2,966
4	1,085	1,085	1,628	0,098	0,291	1,916	2,527
5	1,064	0,952	1,427	0,160	0,370	1,776	2,286
6	1,051	0,858	1,287	0,215	0,428	1,684	2,129
7	1,042	0,788	1,182	0,263	0,473	1,618	2,017
8	1,036	0,733	1,099	0,303	0,509	1,567	1,932
9	1,032	0,688	1,032	0,338	0,539	1,527	1,864
10	1,028	0,650	0,975	0,368	0,563	1,495	1,809

Бокс 7.2 Определение предупредительных и действительных границ для графика \bar{X}_{bar}

На приведенной ниже таблице показаны значения концентрации сперматозоидов, подсчитанные каждым из четырех лаборантов в первых десяти образцах КК, а также вычисления среднего значения и стандартного отклонения для каждого образца.

Образец	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Концентрация сперматозоидов (млн/мл)									
Лаборант А	38	35	40	34	38	36	44	43	39	43
Лаборант В	42	36	42	40	40	40	43	43	46	40
Лаборант С	38	43	40	51	38	33	39	45	35	39
Лаборант D	34	36	36	37	36	39	42	43	46	34
Среднее значение	38,0	37,5	39,5	40,5	38,0	37,0	42,0	43,5	41,5	39,0
Стандартное отклонение (SD)	3,27	3,70	2,52	7,42	1,63	3,16	2,16	1,00	5,45	3,74

Средняя величина средних значений (\bar{X}_{bar}) для первых десяти образцов для КК составляет:

$$(38,0 + 37,5 + \dots + 39,0)/10 = 39,7,$$

а среднее значение стандартных отклонений (S_{bar}):

$$(3,27 + 3,70 + \dots + 3,74)/10 = 3,40.$$

Значения коэффициентов $A_{2,n}$ и $A_{3,n}$ (см. Табл. 7.1) для $n = 4$ равны 1,085 и 1,628, соответственно. Таким образом, предупредительные

контрольные границы (две среднеквадратичные ошибки от среднего значения) составляют:

$$X_{\text{bar}} \pm A_{2,n} \times S_{\text{bar}} = 39,7 \pm (1,085 \times 3,40) = 39,7 \pm 3,7, \text{ или } 36,0 \text{ и } 43,3 \times 10^6 \text{ на мл.}$$

Аналогично действительные контрольные границы (три среднеквадратичные ошибки от среднего значения) составляют:

$$X_{\text{bar}} \pm A_{3,n} \times S_{\text{bar}} = 39,7 \pm (1,628 \times 3,40) = 39,7 \pm 5,5, \text{ или } 34,2 \text{ и } 45,2 \times 10^6 \text{ на мл.}$$

Бокс 7.3 Альтернативный способ вычисления контрольных границ для X_{bar} с помощью совокупного стандартного отклонения

Оценка стандартного отклонения показателей между лаборантами может быть произведена умножением S_{bar} на C_n (он равен 1,085 для выборки $n = 4$ (Табл. 7.1.), что дает 3,69 — значение, близкое к полученному прямыми вычислениями значения для совокупного стандартного отклонения, равного 3,84.

$s = \sqrt{((s_1^2 + s_2^2 + \dots + s_{10}^2)/10)}$, где s_i — стандартное отклонение i -го образца для КК. Данный результат может быть использован для непосредственного вычисления предупредительных и действительных границ для 2 и 3 средних квадратичных ошибок (s/\sqrt{n}) по обе стороны от среднего значения. В данном примере эти предупредительные границы составляют 35.8 и 43,5 млн/мл, а действительные границы — 33.9 и 45,5 млн/мл, соответственно, что очень близко к значениям, полученным с помощью S_{bar} и коэффициентов $A_{2,n}$ и $A_{3,n}$.

7.7.1.2 Нанесение точек на график X_{bar}

Каждый лаборант должен анализировать образцы для КК и наносить значения на контрольный график внутреннего КК. Так как процедура оценки имеет вариацию, образцы для внутреннего КК следует анализировать в процессе рутинной работы, а результаты сравнивать с установленными значениями. Это можно делать путем нанесения на график средних значений, измеренных для образцов КК, и наблюдать, лежат ли результаты в пределах границ вариабельности, определенных для данного метода. Для примера см. Рис. 7.1.

Рис.7.1 График X_{bar} для концентрации сперматозоидов

Средние значения последовательных измерений (\diamond) нанесены на график вместе с измеренным ранее целевым значением (X_{bar}) и предупредительными и действительными границами.

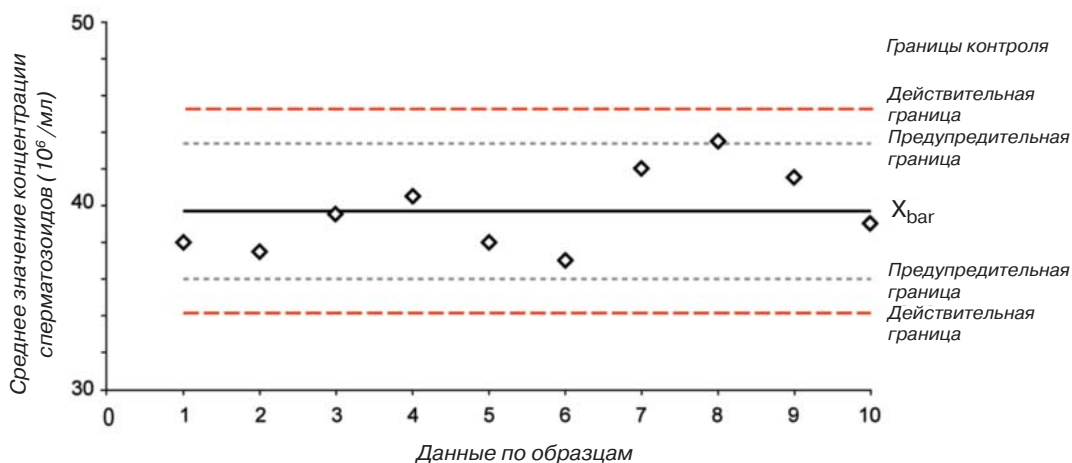


График X_{bar} можно построить и нанести на него предупредительные и действительные контрольные границы для оценки подвижности сперматозоидов, морфологии и их жизнеспособности с последующими пунктами расчета концентрации сперматозоидов (см. Раздел 7.8).

7.7.2 График S

Этот график определяет, существует ли высокая вариабельность результатов между лаборантами. Делают повторные измерения и на временной график наносят результаты среднеквадратичных отклонений. Так как образцы для КК берут из одного и того же хранимого набора, никаких различий между образцами не ожидают, поэтому любые значительные различия между лаборантами могут отражать систематические расхождения в оценках одного или нескольких лаборантов.

7.7.2.1 Расчет контрольных границ графика S

Контрольные границы добавляют на график S аналогично графику X_{bar} . Однако так как распределение стандартного отклонения несимметрично, предупредительные и действительные границы выбирают таким образом, чтобы результаты новых наблюдений лежали вне контрольных границ, как и для графика X_{bar} . Таким образом, предупредительные и действительные границы будут пересекаться в точках 5% и 0,2%, соответственно, как результат только случайной вариации. Эти границы определяют из распределения χ^2 , а факторы $s_{\alpha,n}$ умножают на среднее стандартное отклонение S_{bar} , данное в Табл. 7.1. Примеры с решениями показаны в Боксе 7.4. Результаты, которые лежат ниже нижних границ на графике S, имеют неожиданно низкую вариацию, что может указывать на реальное улучшение в уровне согласованности между лаборантами или на возможный сговор.

Бокс 7.4 Определение предупредительных и действительных контрольных границ для графика S

Используя результаты из Бокса 7.2, получаем среднее стандартное отклонение образца S_{bar} , которое составляет 3,40 млн/мл. Значения коэффициентов $S_{\alpha,n}$ для $n = 4$ берем из Табл. 7.1, что дает:

нижнюю действительную границу	$S_{\text{bar}} \times s_{0,999,4} = 3,40 \times 0,098 = 0,33$ млн/мл
нижнюю предупредительную границу	$S_{\text{bar}} \times s_{0,975,4} = 3,40 \times 0,291 = 0,99$ млн/мл
верхнюю предупредительную границу	$S_{\text{bar}} \times s_{0,025,4} = 3,40 \times 1,916 = 6,51$ млн/мл
верхнюю действительную границу	$S_{\text{bar}} \times s_{0,001,4} = 3,40 \times 2,527 = 8,59$ млн/мл

7.7.2.2 Нанесение точек на график S

Последовательные значения стандартных отклонений наносят на контрольный график для того, чтобы определить, лежат ли они вне области вариабельности (ошибки), определяемой для лабораторных методов. Для примера см. Рис. 7.2.

Рис.7.2 График S для концентрации сперматозоидов

Стандартные отклонения последовательных измерений (\diamond) нанесены на график вместе с измеренным ранее средним значением (S_{bar}) и предупредительными и контрольными границами.

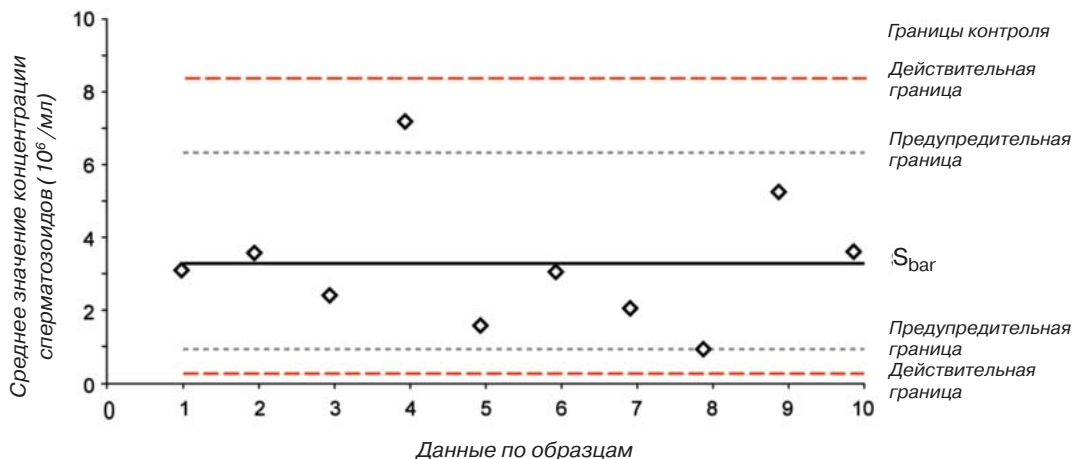


График S можно построить и нанести предупредительные и действительные границы для оценки подвижности, морфологии и жизнеспособности с последующими пунктами расчета концентрации сперматозоидов (см. Раздел 7.8).

7.8 Процедуры контроля качества для процентных значений

Когда сперматозоиды классифицируют на две категории или более (например, морфологически нормальные и аномальные, прогрессивно подвижные и непрогрессивно подвижные, живые или мертвые), среднеквадратичная ошибка оцененного процентного значения внутри категории зависит от истинного, но неизвестного процентного значения, а также от числа подсчитанных сперматозоидов (N). В общем случае приблизительная оценка среднеквадратичной ошибки пропорции, p , равна $\sqrt{p(100-p)/N}$ для значений в диапазоне от 20% до 80%. Вне данного диапазона более подходящий метод — использование углового преобразования (\arcsin квадратного корня), $z = \arcsin^{-1}(\sqrt{p/100})$, где стандартное отклонение равно $1/(2\sqrt{N})$ радиан, те есть зависит только от количества подсчитанных сперматозоидов и не зависит от истинного процентного значения (см. Kuster et al., 2004).

Несмотря на то, что среднеквадратичное отклонение отдельных вычислений должно быть близко этим значениям, среднее значение стандартного отклонения (S_{bar}) будет превышать 2,5% из-за дополнительной вариации между лаборантами. В этом случае основной задачей будет снижение S_{bar} .

7.9 Оценка графиков X_{bar} и S

Лаборантам и их руководителям следует анализировать контрольные графики совместно. Если контрольные значения неприемлемы, следует провести оценку всей процедуры для определения возможных источников вариации.

7.9.1 Как обнаружить значения, лежащие вне контрольных границ

Существуют базовые руководства по контролю качества выполняемых процедур. Графики КК следует сверять с данными руководствами и следовать прописанным в них инструкциям. Существует несколько правил, выявляющих значения вне контрольных, среди них:

- Одна точка лежит вне диапазона 3SD контрольных границ. Это самое простое правило, которое является универсальным. Оно может указывать на случайное большое отклонение в процедуре.
- Две из трех последовательных точки лежат вне действительных контрольных границ.
- Четыре из пяти последовательных точки лежат вне предупреждающих контрольных границ.
- Два последовательных результата лежат выше верхних или ниже нижних предупреждающих контрольных границ.
- Восемь последовательных точек находятся на одной и той же стороне от центральной линии. Это правило привлекательно, так как оно очень простое и чувствительное к градиентному сдвигу, к которому не чувствительно первое правило.

На практике общепринято использование первого и последнего правила. Если образец для КК испорчен, следует указывать чувствительность к различным типам ошибок (случайным или систематическим) (см. Бокс 7.5). Руководитель лаборатории должен анализировать результаты КК регулярно.

Бокс 7.5 Основные правила контроля для графиков КК

Контрольное правило	Указание на ошибку
Один результат вне приемлемых пороговых границ	Случайная
Две из трех последовательных точек лежат вне действительных контрольных границ.	Систематическая
Четыре из пяти точек лежат вне предупреждающих контрольных границ	Систематическая
Два последовательных результата лежат либо выше верхних, либо ниже верхних/нижних предупреждающих контрольных границ	Систематическая
Два последовательных результата, один выше, один ниже верхних/нижних предупреждающих контрольных границ	Случайная
Восемь последовательных результатов, все находятся выше или ниже среднего	Систематическая

7.9.2 Причины появления значения вне контрольных границ

Результаты процедур КК должны быть тщательно проанализированы и обнаружены ошибки в процедурах. Возможные ошибки включают:

- недостаточное перемешивание образца (часто с образцами с повышенной вязкостью и агглютинацией);
- стресс лаборанта (например, неодинаковое приготовление образцов или ошибки записи);
- плохая техника выполнения (например, небрежное пипетирование или манипулирование при создании мазка или наполнении камеры) (см. Раздел 7.13);
- неадекватное обучение (например, систематические различия при определении сперматозоидов для подсчета, классификации нормальных форм, оценке окрашенных головок сперматозоидов или закрученных жгутиков при подсчете живых сперматозоидов и определение подвижных сперматозоидов; смещение от рассчитанных ошибок) (см. Раздел 7.13);
- изменение инструментария (например, неправильная калибровка автоматических пипеток, что приводит к снижению воспроизводимости во время приготовления образца и разведения; разрегулировка микроскопа, которая может снизить оптическую четкость и помешать правильной оценке жизнеспособности или морфологии; неточные весы или мерные цилиндры) (см. Приложение 7, Раздел A7.8);
- повреждение образцов для КК;
- смена оборудования, особенно пипеток и счетных камер;
- изменение процедуры или окружающей обстановки.

7.9.3 Реакция на значения вне контрольных

Когда результаты находятся вне контрольных границ, следует записать возможную причину и предпринятое корректирующее действие. Если проблема не является очевидной, повторный анализ образцов для КК следует провести для того, чтобы проверить, случаен ли первый результат. Если результаты КК остаются вне контрольных границ, необходимо провести выяснение причины и скорректировать процедуру до следующего анализа.

Необходимо выполнить следующее.

- Создать блок-схему всего процесса, пункт за пунктом. В этом могут помочь пропись стандартных лабораторных процедур и Табл. 7.2.–7.5.
- Из составленной блок-схемы выделить пункты, в которых потенциально возможно возникновение ошибки, выявить причины и разработать план избавления от ошибок.
- Собрать больше данных, создать новые контрольные графики и пересмотреть их для определения, является ли ошибка приемлемой для данной процедуры. Такая последовательность идентификации ошибок, разработки и тестирования гипотезы и повторной оценки процесса называется циклом Шухарта или циклом *PDCA* (*plan, do, check, act*).

7.10 Статистические процедуры оценки вариабельности результатов, полученных одним и разными лаборантами

Процедуры КК, основанные на оценке (анализе) образцов нативного эякулята, сходны с процедурами оценки хранимых образцов и позволяют оценить вариабельность результатов внутри и между лаборантами. Однако, так как истинное значение неизвестно, график X_{bar} нельзя использовать, систематическую ошибку (вариации лаборанта) нет возможности оценить. Здесь первичной процедурой КК становится график S для оценки вариабельности между лаборантами и дисперсионный анализ (ANOVA) для оценки систематических различий между лаборантами после подсчета каждого 5 или 10 образца КК.

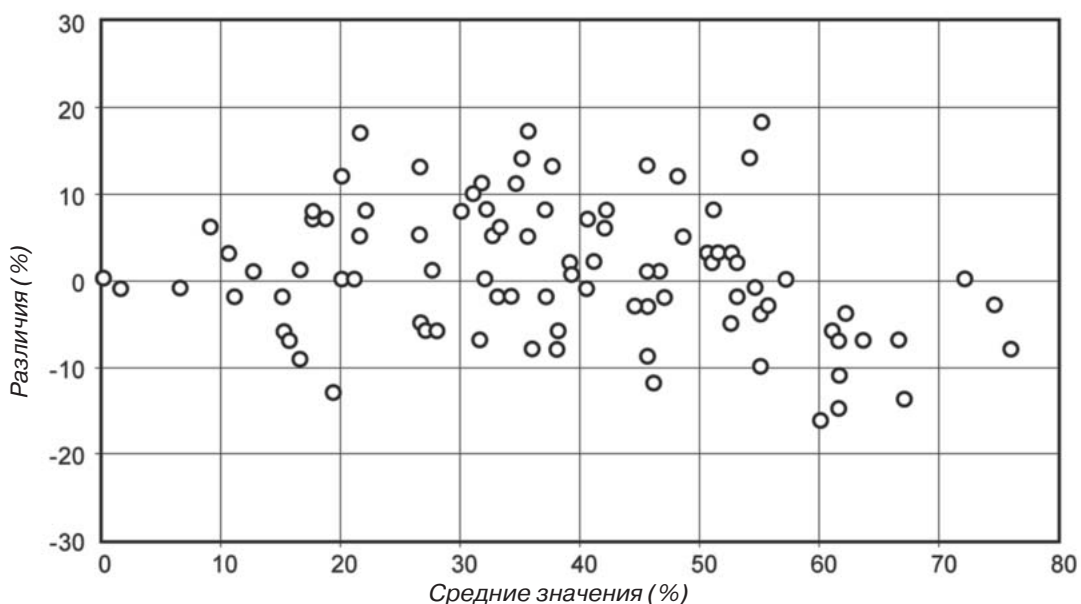
7.10.1 Сравнение результатов от двух и более лаборантов

Результаты двух и более лаборантов можно сравнить несколькими способами.

- Нанесение на график различий между двумя оценками относительно их среднего значения (Bland & Altman, 1986). Сравнение оценок двумя лаборантами концентрации сперматозоидов одного и того же образца следует проводить на рисунке, сходном с Рис. 7.3, на котором сравнивают значения подвижности сперматозоидов, оцененные лаборантом и компьютером.
- Расчет среднего и SD различий (парные сравнения). Так как анализируют один и тот же образец два лаборанта, различие между средними должно быть равно нулю. Все значительные отличия от нуля при оценке

Рис. 7.3 График Бланта-Альтмана для результатов оценки процента прогрессивно подвижных сперматозоидов, выполненной лаборантом и системой CASA

График различий между результатами, полученными двумя методами (лаборант–CASA) против среднего значения (лаборант + CASA)/2).



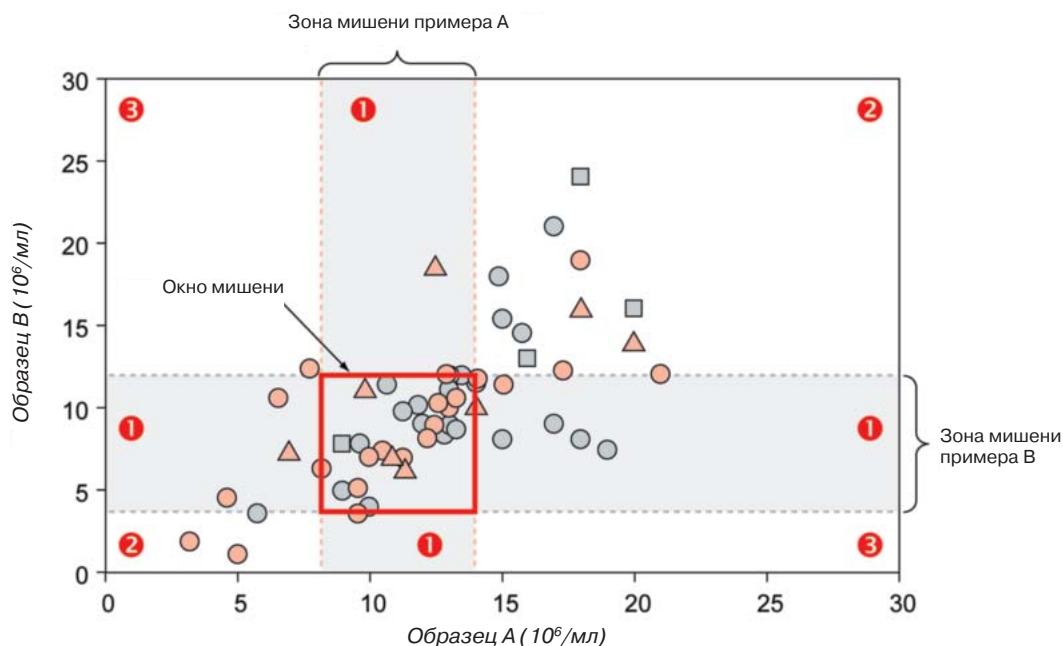
Данные любезно предоставлены Н. W. G. Baker.

парным t-тестом отражают отклонения (систематические различия) между двумя лаборантами.

- Нанесение результатов анализа двух образцов друг напротив друга (график Юдена). Сравнение оценок концентраций, полученных несколькими лаборантами, каждый из которых оценивал два независимых образца, следует проводить на рисунке, аналогичном Рис. 7.4. Для каждого лаборанта (при внутреннем КК) или каждой лаборатории (при внешнем КК) значения двух образцов наносят друг напротив друга. Пунктирная горизонтальная и вертикальная линия указывают на 95% доверительные границы результатов опытных лаборантов (внутренний КК) или референсных лабораторий (внешний КК). Область внутри данных границ — целевое окно, в которое должны попасть значения. Этот график позволяет обнаружить случайные ошибки, когда значения для одного образца находятся в корректном диапазоне, а значения других нет (маркер 1) и систематические ошибки, когда обе оценки образца находятся слишком высоко (верхняя правая область, обозначена 2) или слишком низко (нижняя левая область, обозначенная 2). Случайные ошибки, вероятно, вносит только один образец, так как его оценки лежат слишком низко или слишком высоко (маркер 3).
- Двухвариантный анализ вариаций (дисперсионный анализ). Данный метод описан во многих учебниках по статистике (например, Armitage et al., 2002) и является доступным в компьютерных программах вместе со статистическими тестами для нахождения значимых различий между лаборантами. Как и парное сравнение, описанное выше, различия

Рис. 7.4 График Юдена для оценки концентрации сперматозоидов

Результаты анализа двух образцов (А, В), полученные несколькими лаборантами, наносят напротив друг друга. Результаты каждого лаборанта (или лаборатории при внешнем КК) можно обозначить различными символами и цветом. Результаты, обозначенные 2 — вероятно, появляются из-за систематических ошибок, при этом результаты, обозначенные как 1 и 3, — из-за случайных ошибок.



между всеми оценками, выполненными всеми лаборантами, должны быть равны нулю. Поэтому отличие от среднего значения рассчитывают для каждого образца для каждого лаборанта, а среднее и стандартное отклонение этих различий вычисляют также для каждого лаборанта. Смещения указывают для тех лаборантов, чье абсолютное значение различия оказалось больше 3 среднеквадратичных ошибок среднего значения.

Стандартный статистический тест вычисления различий между лаборантами основан на F-тесте, который имеется в таблице двухстороннего дисперсионного анализа в большинстве компьютерных статистических программ. Среднеквадратичное ошибки ($\hat{\sigma}$) — квадратный корень остатка, или ошибка, среднеквадратичное значение, получаемое из таблицы дисперсионного анализа. Средние различия, превышающие 2,5 стандартных ошибки, вряд ли являются результатом только случайной вариации (< 1,2%). Независимо от того, существенно ли отличаются результаты между лаборантами, необходимо сверять средние значения подсчетов или средние значения различий у лаборантов, чтобы определить, какие из них больше ожидаемых. Так как не во всех компьютерных программах есть возможность определять среднеквадратичную ошибку различий между лаборантами, ее следует вычислить отдельно. При существенных различиях между лаборантами необходим пересмотр всех процедур для повышения совпадения результатов.

Примеры с решениями, описанные в Боксе 7.6, показывают, как рассчитать среднеквадратичную ошибку различий между лаборантами при подсчете концентрации сперматозоидов и определить, является ли она больше ожидаемой. В процессе обработки полученных данных не следует проводить округление, чтобы избежать большого округления ошибки.

7.10.2 Ежемесячный мониторинг средних значений

В то время как основные процедуры внутреннего КК основаны на оценке различий результатов одного лаборанта и между лаборантами, полезная дополнительная информация может быть получена и при мониторинге колебаний результатов анализа спермограммы пациентов.

Для этого на график \bar{X}_{bar} наносят средние значения каждой переменной для всех пациентов, исследованных за определенный период (например, за месяц) времени с предупредительными и действительными границами на 2 и 3 среднеквадратичные ошибки по обе стороны от среднего значения. Стандартная ошибка определяется из стандартного отклонения исходных данных, поделенных на квадратный корень числа анализов эякулята в каждом интервале, либо непосредственно из наблюдаемого распределения средних значений. Контрольные границы следует определять с использованием исследований, проведенных в течение не менее 6 мес и регулярно пересматривать. Для вычисления среднего значения каждого показателя необходимо получить как минимум 20 результатов; небольшие лаборатории могут объединять результаты за период больше одного месяца. Усовершенствование данного метода включает ежемесячный мониторинг средних значений от пациентов с нормальными показателями эякулята и использование графиков кумулятивных сумм (CUSUM) для быстрого вы-

явления любых систематических смещений относительно среднего значения (Barnett, 1979).

Отклонения от ожидаемых значений могут свидетельствовать о различных изменениях в характеристиках пациента (зависимость показателей от времени; изменения в числе повторных тестов одного и того же мужчины; изменения терапии пациентов с различными типами бесплодия) или технических факторов (смена лаборантов, лабораторного оборудования, сезонные колебания температуры и пр.).

7.11 Внешний контроль качества и процедуры обеспечения качества

Внешний контроль качества является неотъемлемой частью процедуры КК (Секан et al., 1995), которая контролирует результаты анализа, при этом методы внешнего обеспечения качества контролируют все процессы в лаборатории от сбора данных до их выдачи пациенту, чтобы гарантировать, что лабораторные процессы находятся под контролем. Внешний КК позволяет лаборатории сравнить свои результаты с данными других клиник. Это позволяет оценить различные методы и сравнить, что невозможно сделать в рамках одной лаборатории.

Внешний КК и внутренний КК являются взаимодополняющими процессами. Внешний КК позволяет выявить проблемы с точностью, с которой невозможно обнаружить при помощи внутреннего КК в связи с недостаточной маскировкой и неправильным отбором контрольных образцов. Внешний КК позволяет лаборатории контролировать точность и стабильность своих методов (Plaut & Westgard, 2002). Однако так как образцы для внешнего КК получены в других лабораториях, с ними необходимо работать особым образом; следует замаскировать их и готовить к исследованию точно также, как и обычные образцы.

Бокс 7.6 Оценка систематических расхождений (по результатам) между лаборантами

В нижеприведенной таблице представлены результаты подсчета тремя лаборантами концентрации сперматозоидов пяти образцов для КК.

Концентрация сперматозоидов (10^6 /мл)

Образец	1	2	3	4	5
Лаборант А	108	45	100	50	92
Лаборант В	103	47	102	50	96
Лаборант С	104	46	89	41	88
Среднее значение	105	46	97	47	92

Расхождения от среднего значения образца (d_{ij}) вычисляют посредством вычитания среднего значения из значений, полученных для каждого образца.

Образец	1	2	3	4	5
Лаборант А	3,0	-1,0	3,0	3,0	0,0
Лаборант В	-2,0	1,0	5,0	3,0	4,0
Лаборант С	-1,0	0,0	-8,0	-6,0	-4,0

Для каждого лаборанта вычисляют среднее значение $m_j = \sum_i d_{ij}/n$ и стандартное отклонение $s_j = \sqrt{(\sum_i d_{ij}^2)/(n - 1)}$, где n — число образцов эякулята.

	Среднее значение (m_j)	SD (s_j)	Среднее значение/Стандартная ошибка ($m_j/se(m_j)$)
Лаборант А	1.600	1.949	1.836
Лаборант В	2.200	2.775	1.773
Лаборант С	-3.800	3.347	-2.539

У лаборанта С расхождение среднего значения на 3,8 млн/мл меньше среднего значения каждого из образцов для КК, или на $5,7 - 3,8 - (1,6 + 2,2)/2 \times 10^6$ /мл меньше, чем среднее арифметическое результатов, полученных двумя другими лаборантами. Для оценки того, находится ли степень недооценки в пределах одной лишь случайной вариации, вычисляют среднеквадратичную ошибку среднего значения из стандартного отклонения расхождений, полученных лаборантами $\sigma = \sqrt{(\sum_j S_j^2)/(t - 1)}$, где t — число лаборантов. В данном случае среднеквадратичная ошибка составляет $3,369 \times 10^6$ на мл. Среднеквадратичная ошибка для среднего значения расхождения, полученного определенным лаборантом, определяется выражением $se(m_j) = \sigma \cdot ((1 - 1/t)/n)$, и составляет $1,230 \times 10^6$ на мл. Абсолютное значение среднего значения расхождения, полученного лаборантом С ($3,8 \times 10^6$ в мл) превышает три среднеквадратичных ошибки и существенно отличается от ожидаемого нулевого значения (в случае отсутствия систематических расхождений между лаборантами).
Общепризнанный статистический тест расхождений в результатах между лаборантами основан на так называемом F-тесте двустороннего дисперсионного анализа с применением коэффициентов для лаборантов и образцов для КК. Ниже приведена таблица дисперсионного анализа, в которой используют вышеприведенные рассчитанные значения концентрации сперматозоидов.

Источник	Сумма квадратов	Степень свободы	Квадрат среднего значения	F-соотношение	P-значение
Образцы для КК	9807,6	4	2451,90	216,03	<0,001
Лаборанты	109,2	2	54,60	4,81	0,042
Ошибка	90,8	8	11,35		
Всего	10007,6	14			

Среднеквадратичная ошибка среднего значения составляет $\sqrt{11,35} = 3,369 \times 10^6$ в мл, как и было определено выше. Как ожидалось, расхождение между значениями образцов для КК очень велики ($p < 0,001$), поскольку они были взяты из различных нативных образцов эякулята. F-тест для расхождений между лаборантами ($F = 4,81$ с двумя и восемью степенями свободы, $p = 0,042$) значим при уровне 0,05, поэтому говорим, что данные расхождения больше, чем можно было бы ожидать в результате одной лишь случайной вариации.

Бокс 7.7 Основные особенности процедур внутреннего контроля качества

Процедура	Обнаруживаемые ошибки	Материал для КК	Число лаборантов
X_{bar}	Смещение, излишняя вариабельность, точность	Хранимый	Один, несколько
S	Смещение/точность	Хранимый/нативный	Несколько
Дисперсионный анализ ANOVA	Смещение/точность	Хранимый/нативный	Несколько
График Бланта-Альтмана	Смещение/точность	Хранимый/нативный	Два
Парные тесты	Смещение/точность	Хранимый/нативный	Два
График Юдена	Смещение/точность	Хранимый/нативный	Несколько

Внешний КК уравнивает опыт и мастерство всех участников, когда для анализа рассылает идентичные образцы всем участникам (Сembrowski & Carey, 1989). Лаборатории представляют свои результаты в центральный офис, где данные оценивают на разброс значений и рассчитывают средние значения и среднеквадратичные отклонения. Список государственных программ внешнего КК по семиологическому анализу приведен в Приложении 8.

7.11.1 Оценка результатов внешнего контроля качества

Схемы внешнего КК дают лабораториям информацию как о своих результатах, так и о данных других участников КК. Следует выяснить, получены ли целевые значения при точных вычислениях, при многократных подсчетах на гемоцитометре для концентрации сперматозоидов, с помощью системы CASA для подвижности, а также являются ли полученные результаты данными сертифицированной лаборатории или получены усреднением данных всех участников внешнего КК. Часто результаты представляют графически, например, в виде гистограммы. Если один и тот же образец использовали для внешнего КК несколько раз, указывают смещение и вариабельность результатов конкретной лаборатории.

Когда используют два образца для анализа, часто строят график Юдена, в котором значения для каждого образца наносят по осям X и Y (см. Рис. 7.4). Области графика, в которых лаборатории отличаются по своим оценкам, ясно показывают масштаб и разброс нанесенных значений. Можно также нанести дополнительные данные, например, с помощью разных символов или цветов указать использование различных методик (счетные камеры, окрашивание или оценочные критерии) или различные лаборатории. Когда рассылает больше двух образцов, можно указать различные аспекты смещений (разницу с оцениваемым значением). Они включают:

- Оценка индекса смещения (*bias index score (BIS)*): смещение, поделенное на выбранный коэффициент вариации, $\times 100$, может быть и отрицательной, и положительной;
- Оценка индекса вариации (*variance index score (VIS)*): параметр, аналогичный *BIS*, но всегда положительный;

- Среднее оценок *BIS* и *VIS* (*MRBIS*, *MRVIS*), которые помогают определить тренды.

Низкий *MRBIS* и низкий *MRVIS* указывают на то, что результаты близки к ожидаемым значениям; низкий *MRBIS*, но высокий *MRVIS* указывают на случайную ошибку; высокий *MRBIS* и высокий *MRVIS* — на систематические ошибки.

Простой способ контролировать выполнение — наносить результаты лаборатории (на ось *Y*), а напротив — ожидаемые значения для каждого параметра (ось *X*). График ясно покажет, как близко к ожидаемой линии попали значения лаборатории. Альтернативно, отличия от целевых значений можно показать на графике Бланта-Альтмана (см. Рис. 7.3).

7.11.2 Отношение к результатам, выходящим за рамки контрольных значений

Главный результат проведения внешнего КК связан с выявлением смещения или точности проводимых в лаборатории процедур и методов. Желаемый результат для лаборатории — поддержание или увеличение точности своих методов (Plaut & Westgard, 2002). Лабораториям, чьи результаты постоянно ниже или выше контрольных значений при внешнем КК, необходимо пересмотреть свои методы. Широкий разброс значений при внешнем КК обычно связан с широким разбросом результатов внутреннего КК и указывает на непостоянство оценки от образца к образцу. Технические процедуры следует тщательным образом пересмотреть, чтобы убедиться в их соответствии с рекомендациями, данными в настоящем руководстве.

Соответствующие действия включают процедуры, описанные в разделе, посвященном внутреннему КК (см. Раздел 7.9.3). В Табл. 7.2–7.5 также указаны потенциальные источники ошибок при выполнении семиологического анализа и показаны возможные решения возникающих проблем. Обмен научными сотрудниками между лабораториями часто помогает избавиться от проблем, также полезно обучение персонала в лабораториях с хорошими результатами внешнего КК. Консультант из лаборатории с хорошими результатами внешнего КК способен увидеть ошибки в методах и устранить их для повышения воспроизводимости результатов.

7.12 Частота и приоритетность процедур контроля качества

Образцы для КК следует анализировать в ходе рутинной лабораторной работы. Частота анализа может зависеть от международных или внутренних рекомендаций или от правил, прописанных лицензирующей организацией. Некоторые руководства требуют, чтобы образцы для КК анализировали каждый день, особенно это касается оценки концентрации сперматозоидов; в других — следует анализировать от 1 до 5% всех образцов как образцы для внутреннего КК. Образцы для КК следует использовать следующим образом.

- Для мониторинга работы новых сотрудников и работающего персонала.
- При введении нового лабораторного оборудования, процедур, методов или при создании новых образцов для внутреннего КК.

Бокс 7.8 содержит общие правила по частоте проведения процедур КК; на практике расписание будет зависеть от загруженности лаборатории. Бокс 7.9 показывает приоритетность различных протоколов КК; некоторые процедуры могут быть неосуществимыми в небольших лабораториях.

Бокс 7.8 Расписание процедур контроля качества

Постоянно	Контроль и корреляция результатов одного и того же образца
Еженедельно/ежемесячно	Анализ повторных измерений, выполненных разными лаборантами
Ежемесячно/ежеквартально	Анализ средних значений
Ежеквартально/раз в полгода	Участие во внешнем КК
Раз в полгода/ежегодно	Калибровка пипеток, счетных камер, другого оборудования

Бокс 7.9 Обзор методов контроля качества

Параметр	Материал	Оцениваемое значение	Смещение	Точность	Приоритет (1>2>3)
Концентрация	Нативные образцы для внутреннего КК	Нет		S, дисперсионный анализ ANOVA	1
	Хранящиеся образцы для внутреннего КК	Да	X_{bar}	S	3
	Внешний КК	Да	X_{bar}	S	2
Морфология	Нативные образцы для внутреннего КК	Нет		S, дисперсионный анализ ANOVA	1
	Хранящиеся образцы для внутреннего КК	Да	X_{bar}	S	3
	Внешний КК	Да	X_{bar}	S	2
Подвижность	Нативные образцы для внутреннего КК	Нет		S, дисперсионный анализ ANOVA	1
	Хранящиеся образцы для внутреннего КК	Да	X_{bar}	S	3
	Внешний КК	Да	X_{bar}	S	2
Жизнеспособность	Нативные образцы для внутреннего КК	Нет		S, дисперсионный анализ ANOVA	1
	Хранящиеся образцы для внутреннего КК	Да	X_{bar}	S	3
	Внешний КК	Да	X_{bar}	S	2

7.13 Обучение

Подход, подобный КК, можно использовать при обучении новых сотрудников, введении новых методов исследования или при модификации существующих методов оценки. Система обучения сотрудников должна содержать принципы, описанные ниже.

7.13.1 Практические советы при трудностях с оценкой концентрации сперматозоидов

- Пересмотрите процедуры перемешивания и разведения, квадраты камеры и расчеты.
- Оценивайте образцы в течение 10–15 мин после заполнения камеры, после чего испарение вносит заметное изменение в расположение сперматозоидов внутри камеры.
- Двум лаборантам следует работать вместе, используя шунтовой микроскоп или микроскоп, оборудованный видеокамерой и монитором и сравнивая процедуры разведения, наполнения и подсчета. Им следует подсчитывать одну и ту же наполненную камеру, сравнивая значения по рядам или по квадратам для того, чтобы обнаружить источник различий.
- Используйте шунтовой микроскоп при подсчете и обучении, а также при оценке сперматозоидов в сетке окуляра для того, чтобы решить, подсчитывать ли отдельный сперматозоид на линии и следует ли его включать в расчет.
- Пересмотрите Табл. 7.2.

Таблица 7.2 Источники вариаций (ошибок) при анализе концентрации сперматозоидов и возможные решения

Процедура	Предотвращение	Контроль
Недостаточное перемешивание образца до разведения	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Повторное разведение
Ошибки разведения (например, предполагаемое разведение 1:20 равно 1+20, хотя фактически это 1+19)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК
Нарушение калибровки пипеток (например, на пипетке установлен объем 100 мкл, а в действительности прибор набирает 95 или 110 мкл)	Техническое обслуживание оборудования, прописи стандартных лабораторных процедур	Повторное разведение, Внутренний КК, внешний КК
Использование неподходящих пипеток (например, воздушных, а не с положительным замещением)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Повторное разведение, Внутренний КК, внешний КК
Использование малого объема для разведения, что приводит к появлению нерепрезентативного образца	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Повторное разведение, Внутренний КК, внешний КК

Продолжение табл. 7.2

Остатки спермы на внешней поверхности кончика пипетки до внесения ее в жидкость для разведения	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК
Грязная и мокрая камера	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Повторная оценка
Некорректная оценка или заполнение камеры (например, частицы грязи на опорных ножках камеры могут влиять на ее объем)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Повторная оценка
Чрезмерно большой промежуток времени между перемешиванием спермы и взятием аликвоты для разведения (сперматозоиды в эякуляте начинают сразу же осаждаться)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Повторное разведение и оценка
Чрезмерно большой промежуток времени между перемешиванием разведенного образца и заполнением камеры (сперматозоиды в разведенном эякуляте начинают сразу же осаждаться)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Повторное разведение и оценка
Микроскоп загрязнен или не настроен. Неподходящее увеличение	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур, техническое обслуживание оборудования	Внутренний КК и внешний КК
Не выдерживание временного интервала после наполнения камеры перед началом процедуры подсчета (недостаточно для осаждения клеток)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Повторная оценка, внутренний КК, внешний КК
Гемоцитометр находится не строго горизонтально во время осаждения сперматозоидов или камера держится не во влажной среде во время осаждения клеток	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Повторная оценка, внутренний КК, внешний КК
Ошибочная идентификация сперматозоидов (например, подсчет клеточного дебриса как сперматозоидов или утрата трудноразличимых сперматозоидов)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК, внешний КК
Оценка слишком малого или слишком большого числа рядов на сетке (то есть некорректные вычисления); остановка на середине ряда	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК, внешний КК
Подсчет слишком малого числа сперматозоидов, что приводит к большой ошибке	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК, внешний КК
Непоследовательная оценка сперматозоидов в расчетных квадратах (например, переоценка концентрации, если сперматозоиды оценивать на верхней, нижней, левой и правой границе)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК, внешний КК

Продолжение табл. 7.2

Неисправная работа лабораторного счетчика	Техническое обслуживание оборудования	Внутренний КК, внешний КК
Математические ошибки в расчетах или при учете разведения	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК, внешний КК
Использование камеры с капиллярным заполнением (неравномерное распределение сперматозоидов во время заполнения)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК, внешний КК

7.13.2 Практические советы при затруднении оценки морфологии сперматозоидов

- Придерживайтесь методов, описанных в данном руководстве: изучите микрофотографии и важные комментарии к каждому сперматозоиду.
- Обратите особое внимание на сперматозоиды с пограничной морфологией; их следует классифицировать как аномальные.
- Проводите подсчет и оценку с использованием шунтового микроскопа или микроскопа, оборудованного видеокамерой и монитором.
- Пересмотрите Табл. 7.3.

Таблица 7.3 Источники вариаций (ошибок) при оценке морфологии сперматозоидов и возможные решения

Процедура	Предотвращение	Контроль
Микроскоп загрязнен или не настроен. Неподходящее увеличение	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур, техническое обслуживание оборудования	Внутренний КК, внешний КК
Недостаточное обучение до начала выполнения анализа	Обучение	Внутренний КК, внешний КК
Субъективные методы без четких прописанных руководств	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК, внешний КК
Недостаточное изучение классификационной системы	Обучение	Внутренний КК
Недостаточное перемешивание эякулята перед приготовлением мазка	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК
Плохое приготовление мазка (например, слишком тонкий или слишком толстый)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК
Плохой метод окрашивания (например, слишком светлое, темное окрашивание или слишком много клеточного дебриса)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК

Продолжение табл. 7.3

Оценка сперматозоидов на границах предметного стекла	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК
Попытка оценить сперматозоиды, лежащие не в горизонтальной плоскости, или перекрывающиеся сперматозоиды	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК
Подсчет не всех сперматозоидов в выбранной области, отбор клеток для оценки	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК
Обесцвечивание окрашенного препарата со временем (для образцов, хранимых для КК)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК (контрольные графики)
Ошибки в расчетах процента, если подсчитано число не кратное 100	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК, внешний КК
Неисправная работа лабораторного счетчика	Техническое обслуживание оборудования	Внутренний КК, внешний КК

7.13.3 Практические советы при затруднении оценки подвижности сперматозоидов

- Готовьте препарат непосредственно перед оценкой. Анализ производите после полной остановки смещения жидкости на препарате, чтобы снизить выбросы при оценке суммарной подвижности.
- Отбирайте поля зрения случайным образом и не выбирайте сознательно поля с большим или маленьким числом подвижных сперматозоидов. Один из способов сделать это — избегать смотреть через окуляры до момента выбора расчетного поля.
- Не ждите, пока подвижный сперматозоид достигнет расчетного поля, начинайте подсчет.
- Проводите анализ быстро; в зависимости от концентрации сперматозоидов подсчитывайте небольшую область квадрата одновременно.
- Тратьте как можно меньше времени на оценку одного квадрата, чтобы избежать подсчета сперматозоидов, достигающих области подсчета во время анализа.
- Подсчитывайте прогрессивно подвижные, непрогрессивно подвижные и неподвижные сперматозоиды (в два этапа). Если появились какие-либо проблемы в методе, измените порядок анализа.
- Пересмотрите Табл. 7.4.

Таблица 7.4 Источники вариаций (ошибок) при оценке подвижности сперматозоидов и возможные решения

Процедура	Предотвращение	Контроль
Недостаточное перемешивание образца до взятия аликвоты на анализ	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Повторное приготовление препарата и его оценка, внутренний КК
Слишком большой промежуток времени между приготовлением препарата и анализом (сперматозоиды быстро теряют подвижность)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Повторное приготовление препарата и его оценка, внутренний КК
Неприемлемая температура нагревательной поверхности (например, слишком высокая температура вызывает гибель сперматозоидов)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур, техническое обслуживание оборудования	Внутренний КК
Микроскоп загрязнен или не настроен. Неподходящее увеличение	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур, техническое обслуживание оборудования	Внутренний КК, внешний КК
Потеря окулярной сетки для оценки	Техническое обслуживание оборудования	Внутренний КК (контрольные графики)
Анализ клеток, лежащих на границе покровного стекла (сперматозоиды мертвы или неподвижны в области 5 мм от границы покровного стекла)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Повторный анализ, внутренний КК
Проведение оценки (подсчета) слишком медленно (другие сперматозоиды достигают подсчитываемое поле во время оценки)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК
Неисправная работа лабораторного счетчика	Техническое обслуживание оборудования	Внутренний КК, внешний КК
Ошибки в расчетах процента, если подсчитано число не кратное 100	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК, внешний КК
Субъективные выбросы (то есть постоянно слишком высокий % подвижных или неподвижных сперматозоидов)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК, внешний КК
Предварительные процедуры, которые снижают подвижность (например, измерение температуры, энергичное перемешивание, контаминация токсинами)	Прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК

Продолжение табл. 7.4

Неслучайный выбор полей зрения на анализ. Паузы при оценке подвижности (например, ожидание, когда подвижный сперматозоид достигнет анализируемого квадрата или поля для начала подсчета)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК, внешний КК
---	---	---------------------------

7.13.4 Практические советы при затруднении оценки жизнеспособности сперматозоидов

- Обратите особое внимание на различие между красными (мертвые) и розовыми (живые) головками сперматозоидов (сперматозоиды со слабой окраской розовым рассматривают как живые). Если окрашивание произошло только частично в области шейки, а остальная часть головки осталась неокрашенной, считают, что мембрана шейки частично повреждена, но такую клетку не причисляют к категории мертвых, и общую мембрану не считают разрушенной.
- Проводите анализ с помощью метода эозин-нигрозин (см. Раздел 2.6.1).
- Пересмотрите Табл. 7.5.

Таблица 7.5 Источники вариаций (ошибок) при оценке жизнеспособности сперматозоидов и возможные решения

Процедура	Предотвращение	Контроль
Микроскоп загрязнен или не настроен. Неподходящее увеличение	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур, техническое обслуживание оборудования	Внутренний КК, внешний КК
Неподходящее окрашивание: некоторые методы создают гипоосмотические условия, в которых сперматозоиды погибают	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Сопоставление с подвижностью
Слишком большой промежуток времени до окрашивания	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Сопоставление с подвижностью
Регидратация высушенных мазков, если не производили заключение в гистологические среды, позволяет красителю проникать во все сперматозоиды	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Сопоставление с подвижностью
Переоценка мертвых сперматозоидов (например, считать мертвым сперматозоид с головкой, слегка окрашенной розовым красителем)	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК, внешний КК
Причисление сперматозоида с окрашенной шейкой к категории мертвых	Обучение, прописи стандартных лабораторных процедур	Внутренний КК, внешний КК

ЛИТЕРАТУРА

ЛИТЕРАТУРА

- Abraham-Peskir JV et al. (2002). Response of midpiece vesicles on human sperm to osmotic stress. *Human Reproduction*, 17:375-382.
- Abshagen K et al. (1998). Influence of sperm surface antibodies on spontaneous pregnancy rates. *Fertility and Sterility*, 70:355-356.
- Agarwal A et al. (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine Online*, 8:616-627.
- Aitken RJ, Baker HW (1995). Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good Samaritans? *Human Reproduction*, 10:1736-1739.
- Aitken RJ, Clarkson JS (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81:459-469.
- Aitken RJ, Clarkson JS (1988). Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*, 9:367-376.
- Aitken RJ, Elton RA (1986). Application of a Poisson-gamma model to study the influence of gamete concentration on sperm-ovocyte fusion in the zona-free hamster egg penetration test. *Journal of Reproduction and Fertility*, 78:733-739.
- Aitken RJ, Krausz CG (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, 122:497-506.
- Aitken RJ, West KM (1990). Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*, 13:433-451.
- Aitken RJ et al. (1983). Methods for assessing the functional capacity of human spermatozoa; their role in the selection of patients for in-vitro fertilization. In: Beier H, Lindner H, eds, *Fertilization of the human egg in vitro: Biological basis and clinical application*. Berlin, Springer: 147-168.
- Aitken RJ et al. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *Journal of Cellular Physiology*, 151:466-477.
- Aitken RJ et al. (1993). Analysis of the response of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *Journal of Andrology*, 14:132-141.
- Aitken RJ et al. (2003). Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reproductive Biomedicine Online*, 7:65-70.
- Aitken RJ et al. (2004). Shedding light on chemiluminescence: the application of chemiluminescence in diagnostic andrology. *Journal of Andrology*, 25:455-465.
- Alvarez C et al. (2003). Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Human Reproduction*, 18:2082-2088.
- Alvarez JG et al. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology*, 8:338-348.
- Andersen AG et al. (2000). High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Human Reproduction*, 15:366-372.

- Armitage P et al. (2002). *Statistical methods in medical research*. Oxford, Blackwell Science.
- Auger J, Eustache F (2000). Standardisation de la classification morphologique des spermatozoides humains selon la methode de David modifiee. *Andrologia*, 10:358-373.
- Auger J et al. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New England Journal of Medicine*, 332:281-285.
- Auger J et al. (2001). Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Human Reproduction*, 16:2710-2717.
- Aziz N et al. (1996). The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. *Fertility and Sterility*, 66:1000-1008.
- Aziz N et al. (2004). Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertility and Sterility*, 81:349-354.
- Baker HW, Kovacs GT (1985). Spontaneous improvement in semen quality: regression towards the mean. *International Journal of Andrology*, 8:421-426.
- Barnett RN (1979). *Clinical laboratory statistics*, 2nd ed. Boston, Little, Brown.
- Barratt CLR et al. (1992). The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies. *Human Reproduction*, 7:95-98.
- Barratt CLR et al. (1993). Prognostic significance of computerized motility analysis for in-vivo fertility. *Fertility and Sterility*, 60:520-525.
- Bedford JM (1977). Sperm/egg interaction: the specificity of human spermatozoa. *Anatomical Record*, 188:477-487.
- Behre HM et al. (2000). Diagnosis of male infertility and hypogonadism. In: Nieschlag E, Behre HM, eds. *Andrology, male reproductive health and dysfunction*. Berlin, Springer: 92.
- Berman NG et al. (1996). Methodological issues in the analysis of human sperm concentration data. *Journal of Andrology*, 17:68-73.
- Biggers JD et al. (1971). The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC, ed. *Methods in mammalian embryology*. San Francisco, WH Freeman: 86-116.
- Björndahl L, Barratt CL (2005). Semen analysis: setting standards for the measurement of sperm numbers. *Journal of Andrology*, 26:11.
- Björndahl L, Kvist U (2003). Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reproductive Biomedicine Online*, 7:440-448.
- Björndahl L et al. (2003). Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction*, 18:813-816.
- Björndahl L et al. (2004). Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *Journal of Andrology*, 25:671-678.
- Björndahl L et al. (2005). Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *Journal of Andrology*, 26:170-173.
- Bland JM, Altman DG (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1:307-310.
- Bohring C, Krause W (1999). The intra- and inter-assay variation of the indirect mixed antiglobulin reaction test: is a quality control suitable? *Human Reproduction*, 14:1802-1805.

- Bonde JP et al. (1998). Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*, 352:1172-1177.
- Boomsma CM et al. (2004). Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, CD004507.
- Bourne H et al. (1995). Sperm preparation for intracytoplasmic injection: methods and relationship to fertilization results. *Reproduction, Fertility, Development*, 7:177-183.
- Brazil C et al. (2004a). Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study. *Journal of Andrology*, 25:635-644.
- Brazil C et al. (2004b). Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *Journal of Andrology*, 25:645-656.
- Bronson RA et al. (1982). Detection of sperm specific antibodies on the spermatozoa surface by immunobead binding. *Archives of Andrology*, 9:61.
- Bronson RA et al. (1984). Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertility and Sterility*, 42:171-183.
- Bunge RGT, Sherman JK (1953). Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*, 172:767-768.
- Bunge RG et al. (1954). Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertility and Sterility*, 5:520-529.
- Burkman LJ et al. (1988). The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertility and Sterility*, 49:688-697.
- Canale D et al. (1994). Inter- and intra-individual variability of sperm morphology after selection with three different techniques: layering, swim-up from pellet and Percoll. *Journal of Endocrinological Investigation*, 17:729-732.
- Carey RG, Lloyd RC (1995). *Measuring quality improvement in healthcare: a guide to statistical process control applications*. New York, Quality Resources.
- Carlsen E et al. (2004). Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertility and Sterility*, 82:358-366.
- Carreras A et al. (1992). Sperm plasma membrane integrity measurement: a combined method. *Andrologia*, 24:335-340.
- Castilla JA et al. (2006). Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. *Human Reproduction*, 21:847-851.
- Cekan SZ et al. (1995). *Principles of external quality assessment: a laboratory manual*. Geneva, World Health Organization.
- Cembrowski GS, Carey RN (1989). *Laboratory quality management*. Chicago, ASCP Press.
- Chantler E, Abraham-Peskir JV (2004). Significance of midpiece vesicles and functional integrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress. *Andrologia*, 36:87-93.
- Chemes HE, Rawe YV (2003). Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction Update*, 9:405-428.
- Chiu WW, Chamley LW (2004). Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies. *Fertility and Sterility*, 82:529-535.
- Chohan KR et al. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology*, 27:53-59.

- Christensen P et al. (2005). Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*, 63:992-1003.
- Clarke GN (1999). Sperm cryopreservation: is there a significant risk of cross-contamination? *Human Reproduction* 14:2941-2943.
- Clarke GN et al. (1982). Immunoglobulin class of sperm-bound antibodies in semen. In: Bratanov K, ed. *Immunology of reproduction*. Sofia, Bulgarian Academy of Sciences Press: 482-485.
- Clarke GN et al. (1985). Detection of sperm antibodies in semen using the Immunobead test: a survey of 813 consecutive patients. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, 7:118-123.
- Clarke GN et al. (1997). Artificial insemination and in-vitro fertilization using donor spermatozoa: a report on 15 years of experience. *Human Reproduction*, 12:722-726.
- Clarke GN et al. (2003). Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. *Reproduction, Fertility, Development*, 15:377-381.
- Clarke GN et al. (2006). Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertility and Sterility*, 86:721-722.
- Coetzee K et al. (1998). Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Human Reproduction Update*, 4:73-82.
- Coetzee K et al. (1999a). Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia*, 31:163-168.
- Coetzee K et al. (1999b). Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. *Fertility and Sterility*, 71:80-84.
- Coetzee K et al. (1999c). Clinical value of using an automated sperm morphology analyzer (IVOS). *Fertility and Sterility*, 71:222-225.
- Cooper TG (2005). Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Human Reproduction*, 20:9-11.
- Cooper TG, Yeung CH (1998). A flow cytometric technique using peanut agglutinin for evaluating acrosomal loss from human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 19:542-550.
- Cooper TG, Yeung CH (2006). Computer-aided evaluation of assessment of "grade a" spermatozoa by experienced technicians. *Fertility and Sterility*, 85:220-224.
- Cooper TG et al. (1990a). The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers α -glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *International Journal of Andrology*, 13:329-335.
- Cooper TG et al. (1990b). Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of α -glucosidase in seminal plasma. *International Journal of Andrology*, 13:297-305.
- Cooper TG et al. (1991). Variations in semen parameters from fathers. *Human Reproduction*, 6:859-866.
- Cooper TG et al. (1993). Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Human Reproduction*, 8:1251-1258.
- Cooper TG et al. (1999). Experience with external quality control in spermatology. *Human Reproduction*, 14:765-769.

- Cooper TG et al. (2002). Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *International Journal of Andrology*, 25:306-311.
- Cooper TG et al. (2004). Cytoplasmic droplets are normal structures of human spermatozoa but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. *Human Reproduction*, 19:2283-2288.
- Cooper TG et al. (2005). Changes in osmolality during liquefaction of human semen. *International Journal of Andrology*, 28:58-60.
- Cooper TG et al. (2006). Azoospermia: virtual reality or possible to quantify? *Journal of Andrology*, 27:483-490.
- Cooper TG et al. (2007). Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. *Journal of Andrology*, 28:1-4.
- Cooper TG et al. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16:231-245.
- Corea M et al. (2005). The diagnosis of azoospermia depends on the force of centrifugation. *Fertility and Sterility*, 83:920-922.
- Correa-Perez JR et al. (2004). Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necrospermia. *Fertility and Sterility*, 81:1148-1150.
- Couture M et al. (1976). Improved staining method for differentiating immature germ cells from white blood cells in human seminal fluid. *Andrologia*, 8:61-66.
- Cross NL (1995). Methods for evaluating the acrosomal status of human sperm. In: Fenichel P, Parinaud J, eds. *Human sperm acrosome reaction*. Paris, John Libbey Eurotext (Colloques INSERM): 277-285.
- Cross NL et al. (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research*, 15:213-226.
- Dadoune JP et al. (1988). Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*, 20:211-217.
- Daudin M et al. (2000). Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertility and Sterility*, 74:1164-1174.
- David G et al. (1975). Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. I. Propositions pour un système de classification. *Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 4(Suppl. 1):17-36.
- David G et al. (1980). The success of A.I.D. and semen characteristics: study of 1489 cycles and 192 ejaculates. *International Journal of Andrology*, 3:613-619.
- Davis RO, Katz DF (1992). Standardization and comparability of CASA instruments. *Journal of Andrology*, 13:81-86.
- De Jonge C (2000). Commentary: forging a partnership between total quality management and the andrology laboratory. *Journal of Andrology*, 21:203-205.
- De Jonge C et al. (2004). Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertility and Sterility*, 82:57-65.
- de la Taille A et al. (1998). Correlation of genitourinary abnormalities, spermogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens. *Progress in Urology*, 8:370-376.

- Devillard F et al. (2002). Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Human Reproduction*, 17:1292-1298.
- Donnelly ET et al. (1998). In-vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertility and Sterility*, 70:305-314.
- Douglas-Hamilton DH et al. (2005a). Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *Journal of Andrology*, 26:107-114.
- Douglas-Hamilton DH et al. (2005b). Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *Journal of Andrology*, 26:115-122.
- Drobnis EZ et al. (1988). Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications. *Developmental Biology*, 130:311-323.
- Eggert-Kruse W et al. (1989). Prognostic value of in-vitro sperm penetration into hormonally standardized human cervical mucus. *Fertility and Sterility*, 51:317-323.
- Eggert-Kruse W et al. (1992). Differentiation of round cells in semen by means of monoclonal antibodies and relationship with male fertility. *Fertility and Sterility*, 58:1046-1055.
- Eggert-Kruse W et al. (1993). The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction. *Fertility and Sterility*, 59:617-628.
- Eggert-Kruse W et al. (1996). Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. *Human Reproduction*, 11:139-146.
- Eliasson R (1971). Standards for investigation of human semen. *Andrologia*, 3:49-64.
- Eliasson R (1975). Analysis of semen. In: Behrman SJ, Kistner RW, eds. *Progress in Infertility*, 2nd ed. New York, Little, Brown: 691-713.
- Eliasson R (1981). Analysis of semen. In: Burger H, de Kretser D, eds. *The testis*. New York, Raven Press: 381-399.
- Eliasson R (2003). Basic semen analysis. In: Matson P, ed. *Current topics in andrology*. Perth, Ladybrook Publishing: 35-89.
- Eliasson R et al. (1970). Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie. *Andrologia*, 2:1257.
- ESHRE (1998). Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Human Reproduction*, 13:142-145.
- ESHRE/NAFA (2002). Manual on basic semen analysis (ESHRE Monographs #2). Oxford, Oxford University Press.
- Evenson DP, Wixon R (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 65:979-991.
- Ezeh UI, Moore HM (2001). Redefining azoospermia and its implications. *Fertility and Sterility*, 75:213-214.
- Ezeh UI et al. (1998). Correlation of testicular pathology and sperm extraction in azoospermic men with ejaculated spermatids detected by immunofluorescent localization. *Human Reproduction*, 13:3061-3065.
- Feldschuh J et al. (2005). Successful sperm storage for 28 years. *Fertility and Sterility*, 84:1017.
- Fenichel P et al. (1989). Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence-activated cell sorter. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87:699-706.

- Fetic S et al. (2006). Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 27:294-301.
- Franken DR et al. (1989). The hemizona assay (HZA): a predictor of human sperm fertilizing potential in in-vitro fertilization (IVF) treatment. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 6:44-50.
- Franken DR et al. (2000). Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17:374-378.
- Fredricsson B, Björk G (1977). Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertility and Sterility*, 28:841-845.
- Gandini L et al. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 15:830-839.
- Gao DY et al. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*, 10:1109-1122.
- Garrett C, Baker HWG (1995). A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertility and Sterility*, 63:1306-1317.
- Garrett C et al. (1997). Selectivity of the human sperm-zona pellucida binding process to sperm head morphometry. *Fertility and Sterility*, 67:362-371.
- Garrett C et al. (2003). Automated semen analysis: "zona pellucida preferred" sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Human Reproduction*, 18:1643-1649.
- Gilling-Smith C et al. (2005). Laboratory safety during assisted reproduction in patients with blood-borne viruses. *Human Reproduction*, 20:1433-1438.
- Gilling-Smith C et al. (2006). HIV and reproductive care—a review of current practice. *British Journal of Gynaecology*, 113:869-878.
- Gomez E et al. (1996). Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *Journal of Andrology*, 17:276-287.
- Gomez E et al. (1998). Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *International Journal of Andrology*, 21:81-94.
- Gould JE et al. (1994). Sperm-immunobead binding decreases with in-vitro incubation. *Fertility and Sterility*, 62:167-171.
- Grimes DA, Lopez LM (2007). "Oligozoospermia," "azoospermia," and other semen-analysis terminology: the need for better science. *Fertility and Sterility*, 88:1491-1494.
- Griveau JF, Le Lannou D (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology*, 20:61-69.
- Handelsman DJ et al. (1984). Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *International Journal of Andrology*, 7:369-382.
- Haugen TB, Grotmol T (1998). pH of human semen. *International Journal of Andrology*, 21:105-108.

- Heite H-J, Wetterauer W (1979). Acid phosphatase in seminal fluid: method of estimation and diagnostic significance. *Andrologia*, 11:113-122.
- Hellstrom WJG et al. (1989). A comparison of the usefulness of SpermMar and Immunobead tests for the detection of antisperm antibodies. *Fertility and Sterility*, 52:1027-1031.
- Henkel R et al. (2004). Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility*, 81:965-972.
- Henley N et al. (1994). Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human spermatozoa: a new method using a photoactivated supravital stain. *International Journal of Andrology*, 17:78-84.
- Holstein AF et al. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1:107.
- Homyk M et al. (1990). Differential diagnosis of immature germ cells in semen utilizing monoclonal antibody MHS-10 to the intra-acrosomal antigen SP-10. *Fertility and Sterility*, 53:323-330.
- Hossain AM et al. (1998). Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Human Reproduction*, 13:1578-1583.
- Hotchkiss RS (1945). *Fertility in men*. London, William Heineman Medical Books.
- Huggins C et al. (1942). Chemical composition of human semen and of the secretions of the prostate and seminal vesicles. *American Journal of Physiology*, 136:467-473.
- IARC (1982). *Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans*. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 4): 169-170.
- Inslar V et al. (1972). The cervical score. A simple semiquantitative method for monitoring of the menstrual cycle. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 10:223-228.
- Irvine DS et al. (1994). A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. *Human Reproduction*, 9:2324-2334.
- Ivic A et al. (2002). Critical evaluation of methylcellulose as an alternative medium in sperm migration tests. *Human Reproduction*, 17:143-149.
- Iwamoto T et al. (2006). Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Human Reproduction*, 21:760-765.
- Iwasaki A, Gagnon C (1992). Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility*, 57:409-416.
- Jaffe TM et al. (1998). Sperm pellet analysis: a technique to detect the presence of sperm in men considered to have azoospermia by routine semen analysis. *Journal of Urology*, 159:1548-1550.
- Jeyendran RS et al. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70:219-228.
- Johanisson E et al. (2000). Evaluation of "round cells" in semen analysis: a comparative study. *Human Reproduction Update*, 6:404-412.
- Johnsen O, Eliasson R (1987). Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc in human seminal plasma. *International Journal of Andrology*, 10:435-440.

- Johnson DE et al. (1996). Glass wool column filtration versus mini-Percoll gradient for processing poor quality semen samples. *Fertility and Sterility*, 66:459-462.
- Jones DM et al. (1986). Immobilization of sperm by condoms and their components. *Clinical Reproduction and Fertility*, 4:367-372.
- Jones R et al. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids by human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 31:531-537.
- Jørgensen N et al. (2001). Regional differences in semen quality in Europe. *Human Reproduction*, 16:1012-1019.
- Jouannet P et al. (1988). Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *International Journal of Andrology*, 11:379-394.
- Kamischke A et al. (2004). Cryopreservation of sperm from adolescents and adults with malignancies. *Journal of Andrology*, 25:586-592.
- Karvonen MJ, Malm M (1955). Colorimetric determination of fructose with indol. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*, 7:305-307.
- Katz DF et al. (1986). Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *Journal of Andrology*, 7:203-210.
- Keel BA (2006). Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertility and Sterility*, 85:128-134.
- Keel BA, Webster BW (1993). Semen cryopreservation methodology and results. In: Barratt CLR, Cooke ID, eds. *Donor insemination*. Cambridge, Cambridge University Press: 71-96.
- Kraemer M et al. (1998). Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Human Reproduction*, 13:611-619.
- Krause W (1995). Computer-assisted sperm analysis system: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. *Human Reproduction*, 10 (Suppl. 1): 60-66.
- Krausz C et al. (1992). Development of a technique for monitoring the contamination of human semen samples with leucocytes. *Fertility and Sterility*, 57:1317-1325.
- Kremer J (1965). A simple sperm penetration test. *International Journal of Fertility*, 10:209-215.
- Kremer J, Jager S (1980). Characteristics of anti-spermatozoal antibodies responsible for the shaking phenomenon, with special regard to immunoglobulin class and antigenreactive sites. *International Journal of Andrology*, 3:143-152.
- Kruger TF et al. (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in in-vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 46:1118-1123.
- Kruger TF et al. (1987). A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Archives of Andrology*, 18:275-277.
- Kruger TF et al. (1991). Hemizona assay: use of fresh versus salt-stored human oocytes to evaluate sperm binding potential to the zona pellucida. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 8:154-156.
- Kruger TF et al. (1993). The self teaching programme for strict sperm morphology. Bellville, South Africa, MQ Medical.
- Kuster CE et al. (2004). Determining sample size for the morphological assessment of sperm. *Theriogenology*, 61:691-703.

- Lacquet FA et al. (1996). Slide preparation and staining procedures for reliable results using computerized morphology. *Archives of Andrology*, 36:133-138.
- Larsen L et al. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human Reproduction*, 15:1562-1567.
- Le Lannou D, Lansac J (1993). Artificial procreation with frozen donor semen: the French experience of CECOS. In: Barratt CLR, Cooke ID, eds. *Donor insemination*. Cambridge, Cambridge University Press: 152-169.
- Le Lannou D et al. (1992). Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Human Reproduction*, 7:1417-1421.
- Lee JD et al. (1996). Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Human Reproduction*, 11:1942-1946.
- Leibo SP et al. (2002). Cryopreservation of human spermatozoa. In: Vayena E et al., eds. *Current practices and controversies in assisted reproduction*. Geneva, World Health Organization: 152-165.
- Lentner C (1981). *Geigy scientific tables*. Vol. 1: Units of measurement, body fluids, composition of the body, nutrition. Basle, Ciba-Geigy: 50.
- Lindsay KS et al. (1995). Classification of azoospermic samples. *Lancet*, 345:1642.
- Liu DY, Baker HWG (1988). The proportion of human sperm with poor morphology but normal intact acrosomes detected with *Pisum sativum* agglutinin correlates with fertilization in vitro. *Fertility and Sterility*, 50:288-293.
- Liu DY, Baker HWG (1992a). Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94:71-84.
- Liu DY, Baker HW (1992b). Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertility and Sterility*, 58:465-483.
- Liu DY, Baker HWG (1994). Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro. *Human Reproduction*, 9:1694-1700.
- Liu DY, Baker HWG (1996). Relationship between the zonae pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction with the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding. *Fertility and Sterility*, 66:312-315.
- Liu DY, Baker HWG (2003). Disordered zona pellucida induced acrosome reaction and failure of in-vitro fertilization in patients with unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 79:74-80.
- Liu DY, Baker HW (2004). High frequency of defective sperm-zona pellucida interaction in oligozoospermic infertile men. *Human Reproduction*, 19:228-233.
- Liu DY et al. (1988). A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro. *Fertility and Sterility*, 50:782-788.
- Liu DY et al. (1989). A sperm-zona pellucida binding test and in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 52:281-287.
- Liu DY et al. (1990). Use of oocytes that failed to be fertilized in vitro to study human sperm-oocyte interactions: comparison of sperm-olemma and

- sperm-zona pellucida binding, and relationship with results of IVF. Reproduction, Fertility, Development, 2:641-650.
- Liu DY et al. (1991a). Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. Journal of Andrology, 12:231-239.
- Liu DY et al. (1991b). Horse and marmoset sperm bind to the zona pellucida of salt stored human oocytes. Fertility and Sterility, 56:764-767.
- Liu DY et al. (2003). Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. Human Reproduction, 18:2382-2389.
- Liu DY et al. (2004). Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in in-vitro fertilization—embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. Fertility and Sterility, 82:1251-1263.
- MacLeod J, Wang Y (1979). Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. Fertility and Sterility, 31:103-116.
- MacMillan RA, Baker HW (1987). Comparison of latex and polyacrylamide beads for detecting sperm antibodies. Clinical Reproduction and Fertility, 5:203-209.
- Mahadevan M et al. (1981). Noninvasive method of semen collection for successful artificial insemination in a case of retrograde ejaculation. Fertility and Sterility, 36:243-247.
- Mahmoud AM et al. (1997). The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. Fertility and Sterility, 68:340-345.
- Martin RH et al. (2003). A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. Biology of Reproduction, 69:535-539.
- Matson PL (1995). External quality assessment for semen analysis and sperm antibody detection: results of a pilot scheme. Human Reproduction, 10:620-625.
- McKinney KA et al. (1996). Reactive oxygen species generation in human sperm: luminol and lucigenin chemiluminescence probe. Archives of Andrology, 36:119-125.
- Meinertz H, Bronson R (1988). Detection of antisperm antibodies on the surface of motile spermatozoa. Comparison of the immunobead binding technique (IBT) and the mixed antiglobulin reaction (MAR). American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology, 18:120-123.
- Menkveld R, Kruger TF (1990). Basic semen analysis. In: Acosta AA et al., eds. Human spermatozoa in assisted reproduction. Baltimore, Williams & Wilkins: 68-84.
- Menkveld R, Kruger TF (1996). Evaluation of sperm morphology by light microscopy. In: Acosta AA, Kruger TF, eds. Human spermatozoa in assisted reproduction, 2nd ed. London, Parthenon Publishing: 89-107.
- Menkveld R et al. (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Human Reproduction, 5:586-592.
- Menkveld R et al. (1991). Sperm selection capacity of the human zona pellucida. Molecular Reproduction and Development, 30:346-352.
- Menkveld R et al. (1997). Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology by manual and computerized methods. Andrologia, 29:1-7.
- Menkveld R et al. (2001). Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards

- standardization of in-vivo thresholds. *Human Reproduction*, 16:1165-1171.
- Meschede D et al. (1993). Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis. *International Journal of Andrology*, 16:362-369.
- Meseguer M et al. (2006). Sperm cryopreservation in oncological patients: a 14-year followup study. *Fertility and Sterility*, 85:640-645.
- Moghissi KS (1976). Post-coital test: physiological basis, technique and interpretation. *Fertility and Sterility*, 27:117-129.
- Moghissi KS et al. (1964). Mechanism of sperm migration. *Fertility and Sterility*, 15:15-23.
- Möllering H, Gruber W (1966). Determination of citrate with citrate lyase. *Analytical Biochemistry*, 17:369-376.
- Morshedi M et al. (2003). Efficacy and pregnancy outcome of two methods of semen preparation for intrauterine insemination: a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*, 79 (Suppl. 3): 1625-1632.
- Mortimer D (1994a). *Practical laboratory andrology*. Oxford, Oxford University Press.
- Mortimer D (1994b). Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reproductive Medicine Review*, 3:97-111.
- Mortimer D (2004). Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reproductive Biomedicine Online*, 9:134-151.
- Mortimer D, Menkveld R (2001). Sperm morphology assessment — historical perspectives and current opinions. *Journal of Andrology*, 22:192-205.
- Mortimer D, Mortimer S (2005). *Quality and risk management in the IVF laboratory*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Mortimer D et al. (1995). Workshop report: clinical CASA—the quest for consensus. *Reproduction, Fertility and Development*, 7:951-959.
- Nahoum CRD, Cardozo D (1980). Staining for volumetric count of leukocytes in semen and prostate-vesicular fluid. *Fertility and Sterility*, 34:68-69.
- Neuwinger J et al. (1990). External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertility and Sterility*, 54:308-314.
- Neuwinger J et al. (1991). Hyaluronic acid as a medium for human sperm migration tests. *Human Reproduction*, 6:396-400.
- Ng FL et al. (1992). Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Human Reproduction*, 7:261-266.
- Ng KK et al. (2004). Sperm output of older men. *Human Reproduction*, 19:1811-1815.
- Oehninger S et al. (1993). The specificity of human spermatozoa/zona pellucida interaction under hemi-zona assay conditions. *Molecular Reproduction and Development*, 35:57-61.
- Oei SG et al. (1995). When is the post-coital test normal? A critical appraisal. *Human Reproduction*, 10:1711-1714.
- Overstreet JW et al. (1980). In-vitro capacitation of human spermatozoa after passage through a column of cervical mucus. *Fertility and Sterility*, 34:604-606.
- Paquin R et al. (1984). Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal α 1,4-glucosidase. *Journal of Andrology*, 5:277-282.

- Pelfrey RJ et al., (1982). Abnormalities of sperm morphology in cases of persistent infertility after vasectomy reversal. *Fertility and Sterility*, 38:112-114.
- Pérez-Sánchez F et al. (1994). Improvement in quality of cryopreserved human spermatozoa by swim-up before freezing. *International Journal of Andrology*, 17:115-120.
- Perloff WH, Steinberger E (1963). In-vitro penetration of cervical mucus by spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 14:231-236.
- Perloff WH et al. (1964). Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor technique. *Fertility and Sterility*, 15:501-504.
- Plaut DA, Westgard JOW (2002). QC external quality assessment. In: Westgard JO, ed. *Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories*. Madison, WI, QC Publishing: 125-163.
- Poland ML et al. (1985). Variation of semen measures within normal men. *Fertility and Sterility*, 44:396-400.
- Polge C et al. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164:626-627.
- Pound N et al. (2002). Duration of sexual arousal predicts semen parameters for masturbatory ejaculates. *Physiology and Behavior*, 76:685-689.
- Punab M et al. (2003). The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia*, 35:271-278.
- Quinn P et al. (1985). Improved pregnancy rate in human in-vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertility and Sterility*, 44:493-498.
- Rajah SV et al. (1992). Comparison of mixed antiglobulin reaction and direct immunobead test for detection of sperm-bound antibodies in subfertile males. *Fertility and Sterility*, 57:1300-1303.
- Rao B et al. (1989). Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Research*, 24:127-134.
- Rhemrev J et al. (1989). Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Fertility and Sterility*, 51:685-690.
- Rose NR et al. (1976). Techniques for detection of iso- and auto-antibodies to human spermatozoa. *Clinical and Experimental Immunology*, 23:175-199.
- Rossi AG, Aitken RJ (1997). Interactions between leukocytes and the male reproductive system. The unanswered questions. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 424:245-252.
- Said TM et al. (2004). Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility. *Fertility and Sterility*, 82:871-877.
- Sakkas D et al. (1998). Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reproduction*, 13(Suppl. 4):11-19.
- Savasi V et al. (2007). Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples. *Human Reproduction*, 22:772-777.
- Sawyer DE et al. (2003). Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutation Research*, 529:21-34.
- Scarselli G et al. (1987). Approach to immunological male infertility: a comparison between MAR test and direct immunobead test. *Acta Europea Fertilitatis*, 18:55-57.

- Schmidt KL et al. (2004). Assisted reproduction in male cancer survivors: fertility treatment and outcome in 67 couples. *Human Reproduction*, 19:2806-2810.
- Seaman EK et al. (1996). Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads. *Fertility and Sterility*, 66:662-665.
- Shah VP et al. (2000). Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress. *Pharmacological Research*, 17:1551-1557.
- Sharif K (2000). Reclassification of azoospermia: the time has come? *Human Reproduction*, 15:237-238.
- Sharma RK et al. (2001). Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *Journal of Andrology*, 22:575-583.
- Sherman JK (1990). Cryopreservation of human semen. In: Keel BA, Webster BW, eds. *CRC handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*. Boca Raton, CRC Press: 229-259.
- Shibahara H et al. (2004). Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. *International Journal of Andrology*, 27:63-68.
- Slama R et al. (2002). Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Human Reproduction*, 17:503-515.
- Smith R et al. (1996). Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Human Reproduction*, 11:1655-1660.
- Sobrero AJ, MacLeod J (1962). The immediate postcoital test. *Fertility and Sterility*, 13:184-189.
- Soler C et al. (2000). Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm heads. *International Journal of Andrology*, 23:77-84.
- Tedder RS (1995). Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*, 346:137-140.
- Tomlinson M (2005). Managing risk associated with cryopreservation. *Human Reproduction*, 20:1751-1756.
- Tomlinson MJ et al. (1993). Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertility and Sterility*, 60:1069-1075.
- Toner JP et al. (1995). Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination. *Andrologia*, 27:143-148.
- Tyler JP et al. (1982a). Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation. I. Clinical characteristics. *Clinical Reproduction and Fertility*, 1:273-285.
- Tyler JP et al. (1982b). Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation II. Spermatozoal vitality and storage. *Clinical Reproduction and Fertility*, 1:287-293.
- Van der Merwe FH et al. (2005). The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 59:86-91.
- Van Waart J et al. (2001). Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Human Reproduction Update*, 7:495-500.
- Verheyen G et al. (1993). Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Human Reproduction*, 8:1678-1684.

- Virro MR et al. (2004). Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility*, 81:1289-1295.
- von der Kammer H et al. (1991). The evaluation of markers of prostatic function. *Urological Research*, 19:343-347.
- von Eckardstein S et al. (2000). Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, 73:1226-1231.
- Watson PF (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, 7:871-891.
- Weiske WH (1994). Minimal invasive Vasektomie mittels Fulgurationstechnik. Erfahrungen bei 1000 Patienten in 12 Jahren. *Urologe*, B34:448-452.
- Weiske WH et al. (2000). Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia. *Andrologia*, 32:13-18.
- Westgard JO (2002). Foreword to the second edition. In: Westgard JO, ed. *Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories*. Madison, WI, QC Publishing.
- Wheeler DJ (1993). *Understanding variation: the key to managing chaos*. Knoxville, TN, SPC Press.
- Wheeler DJ, Chambers DS (1992). *Understanding statistical process control*, 2nd ed. Knoxville, TN, SPC Press.
- WHO (1986). Consultation on the zona-free hamster oocyte penetration test and the diagnosis of male fertility. *International Journal of Andrology*, (Suppl. 6).
- WHO (1987). (prepared by Comhaire F et al.) Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *International Journal of Andrology*, (Suppl. 7): 22-24.
- WHO (1996). Task Force for the Regulation of Male Fertility. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertility and Sterility*, 65:821-829.
- WHO (1999). *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, 4th ed. Cambridge, Cambridge University Press.
- WHO (2004). *Laboratory biosafety manual*, 3rd ed. Geneva, World Health Organization (<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546506.pdf>, last accessed 25 February 2010).
- Wilton LJ et al. (1988). Human male infertility caused by degeneration and death of sperms in the epididymis. *Fertility and Sterility*, 49:1051-1058.
- Wolf DP (1995). Semen cryopreservation. In: Keye WR et al., eds. *Infertility evaluation and treatment*. Philadelphia, WB Saunders: 686-695.
- Wolff H (1995). The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 63:1143-1157.
- Woods EJ et al. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48:146-156.
- Yanagimachi R et al. (1979). Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 31:562-574.

- Zavos PM, Goodpasture JC (1989). Clinical improvements of specific seminal deficiencies via intercourse with a seminal collection device versus masturbation. *Fertility and Sterility*, 51:190-193.
- Zinaman MJ et al. (1996). Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *Journal of Andrology*, 17:288-292.
- Zinaman MJ et al. (2000). Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *Journal of Andrology*, 21:145-153.
- Zorn B et al. (2003). Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *International Journal of Andrology*, 26:279-285.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 Нормативные значения и классификация показателей эякулята

А1.1 Нормативные значения

Параметры, рассчитанные на образце спермы, необходимо сравнить с референсными значениями для того, чтобы принять решение о ведении пациента и определить порог в клинических или исследовательских программах. Референсные значения, приведенные здесь, выведены из результатов нескольких проспективных одномоментных поперечных углубленных исследований качества эякулята и фертильности. Они включали прямой ретроспективный отбор фертильных мужчин, которые имели половую партнершу, забеременевшую в течение 12 мес после прекращения использования контрацепции (Cooper et al., 2010).

- Только единственный образец спермы на одного мужчину (первый образец, если присутствовало несколько), полученный при длительности полового воздержания 2–7 дней, был включен в данное исследование.
- Объем эякулята измеряли с использованием методов, рекомендованных ВОЗ, а именно, путем или взвешивания, или переноса в пипетку, или с помощью градуированного сосуда. Общее число сперматозоидов рассчитывали из концентрации, измеряемой в гемоцитометре, фиксированного образца после разжижения. Общую подвижность (PR+NP), прогрессивную подвижность (PR), непрогрессивную подвижность (NP) и неподвижные сперматозоиды (IM) оценивали при комнатной температуре или при 37°С. Данные о морфологии сперматозоидов получали только от лабораторий, обеспечивающих значения, не превышающие ожидаемый максимальный уровень при расчете по «строгим» критериям (метод Tygerberg) (приблизительно 35% нормальных форм). Жизнеспособность определяли по окрашиванию головки сперматозоида красителем (эозин).
- Статистическая традиция использует 2,5-й перцентиль на двухстороннем референсном интервале, так как пороговое значение лежит ниже значения, которое, как можно полагать, отражает различие популяции. Однако односторонний референсный интервал является более подходящим для параметров эякулята, так как высокие показатели не влияют на фертильность. 5-й перцентиль минимальных референсных значений приведен в Табл. А1.1, а вся частота распределения — в Табл. А1.2.

Комментарий 1: Референсное распределение в Табл. А1.2. описывает параметры спермы мужчин, партнерши которых забеременели в течение 12 мес после прекращения предохранения.

Комментарий 2: Отцы составляли отдельную группу мужчин, а их семиологические характеристики могли отличаться от параметров здоровых мужчин в общей популяции.

Комментарий 3: Характеристики эякулята являются высоко вариабельными как у одного мужчины, так и между пациентами, и не служат

единственным показателем фертильности супружеской пары; именно поэтому указанные диапазоны описывают только фертильный статус мужчины.

Комментарий 4: Параметры эякулята, которые лежат в пределах 95% доверительного интервала, не гарантируют фертильность.

Комментарий 5: Мужчины, чьи семиологические характеристики попадают ниже минимальных референсных значений, представленных здесь, необязательно бесплодны; параметры их эякулята лежат ниже референсных значений, определенных для молодых отцов, эти мужчины составляют 5% фертильного диапазона.

Комментарий 6: Показатели эякулята пациента следует интерпретировать только вместе с клиническими данными.

Комментарий 7: Существуют региональные различия в показателях эякулята, и также различия между лабораториями; лабораториям следует обсудить свой собственный диапазон референсных значений, рассчитанных с помощью методик, описанных в настоящем руководстве.

Комментарий 8: Время достижения беременности зависит также и от фертильного статуса женщины.

Таблица А1.1 Минимальные референсные значения показателей эякулята (5-й процентиль и 95%-й доверительный интервал)

Показатель	Минимальное референсное значение
Объем эякулята (мл)	1,5 (1,4–1,7)
Общее количество сперматозоидов в эякуляте (10^6 на эякулят)	39 (33–46)
Концентрация сперматозоидов (10^6 на мл)	15 (12–16)
Общая подвижность (PR+NP, %)	40 (38–42)
Прогрессивно подвижные (PR, %)	32 (31–34)
Жизнеспособность (живые сперматозоиды, %)	58 (55–63)
Морфология сперматозоидов (нормальные формы, %)	4 (3,0–4,0)
Остальные показатели эякулята	
pH	$\geq 7,2$
Пероксидаза-положительные лейкоциты (10^6 на мл)	$< 1,0$
MAR-тест (подвижные сперматозоиды со связанными шариками, %)	< 50
Тест с иммунными шариками (подвижные сперматозоиды со связанными шариками, %)	< 50
Содержание цинка в семенной плазме (мкмоль/эякулят)	$\geq 2,4$
Содержание фруктозы в семенной плазме (мкмоль/эякулят)	≥ 13
Содержание нейтральной глюкозидазы в семенной плазме (мЕд/эякулят)	≥ 20

Таблица А1.2 Распределение значения показателей эякулята мужчин, чьи половые партнерши забеременели в течение 12 мес после прекращения предохранения

Показатель	N	Процентиль								
		2,5	5	10	25	50	75	90	95	97,5
Объем эякулята (мл)	1941	1,2	1,5	2,0	2,7	3,7	4,8	6,0	6,8	7,6
Общее количество сперматозоидов в эякуляте (10 ⁶ на эякулят)	1859	23	39	69	142	255	422	647	802	928
Концентрация сперматозоидов (10 ⁶ на мл)	1859	9	15	22	41	73	116	169	213	259
Общая подвижность (PR+NP, %)	1781	34	40	45	53	61	69	75	78	81
Прогрессивно подвижные (PR, %)	1780	28	32	39	47	55	62	69	72	75
Непрогрессивно подвижные (NP, %)	1778	1	1	2	3	5	9	15	18	22
Неподвижные сперматозоиды (IM, %)	1863	19	22	25	31	39	46	54	59	65
Жизнеспособность (живые сперматозоиды, %)	428	53	58	64	72	79	84	88	91	92
Морфологически нормальные сперматозоиды, %)	1851	3	4	5,5	9	15	24,5	36	44	48

Источник: Cooper et al., 2010.

А1.2 Классификация

Данное руководство оставляет прежнюю классификацию для описания отклонений показателей эякулята от референсных значений (см. Табл. А1.3), хотя некоторые исследователи приводят доводы против такой терминологии (Grimes & Lopez, 2007). Классификация просто описывает качество эякулята и не говорит о каких-либо биологических причинах данных состояний (Eliasson et al., 1970). Эти термины используют для описания образцов спермы, показатели которых лежат за пределами референсных значений и поэтому пригодны для различных популяций. Большинство терминов классификации описывают один параметр. Однако термин «нормозооспермия» связан с тремя показателями — количеством, подвижностью и морфологией. Именно поэтому отклонения от референсных значений каждого показателя может быть описано отдельно.

Литература

- Cooper TG et al. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16:231-245.
- Grimes DA, Lopez LM (2007). «Oligozoospermia», «azoospermia», and other semen-analysis terminology: the need for better science. *Fertility and Sterility*, 88:1491-1494.
- Eliasson R et al. (1970). Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie. *Andrologia*, 2:1257.

Таблица А1.3 Классификация показателей эякулята

Аспермия	Отсутствие эякулята (или ретроградная эякуляция)
Астенозооспермия	Процент прогрессивно-подвижных сперматозоидов (PR) ниже нормативных значений
Астенотератозооспермия	Процент как прогрессивно-подвижных (PR), так и морфологически нормальных сперматозоидов ниже нормативных значений
Азооспермия	Сперматозоиды в эякуляте отсутствуют
Гемоспермия (гематоспермия)	Присутствие эритроцитов в эякуляте
Криптозооспермия	Сперматозоиды отсутствуют в нативном препарате, но присутствуют в осадке эякулята
Лейкоспермия (лейкоцитоспермия, пиоспермия)	Присутствие лейкоцитов в эякуляте выше нормативных значений
Некрозооспермия	Низкий процент живых и высокий процент неподвижных сперматозоидов в эякуляте
Нормозооспермия	Общее число (или концентрация*) сперматозоидов и процент прогрессивно-подвижных (PR) и морфологически нормальных сперматозоидов равно или выше нормативных значений
Олигоастенозооспермия	Общее число (или концентрация*) и процент прогрессивно-подвижных (PR) сперматозоидов ниже нормативных значений
Олигоастенотератозооспермия	Общее число (или концентрация*) сперматозоидов и процент как прогрессивно-подвижных (PR), так и морфологически нормальных сперматозоидов ниже нормативных значений
Олиготератозооспермия	Общее число (или концентрация*) сперматозоидов и процент морфологически нормальных сперматозоидов ниже нормативных значений
Олигозооспермия	Общее число (или концентрация*) сперматозоидов ниже нормативных значений
Тератозооспермия	Процент морфологически нормальных сперматозоидов ниже нормативных значений

* Предпочтение всегда следует отдавать общему количеству сперматозоидов в эякуляте, так как этот параметр более важен по сравнению с концентрацией.

Важно: Суффикс «-спермия» всегда относится к эякуляту, а «-зооспермия» — к сперматозоидам. Именно поэтому не следует использовать следующие термины: астеноспермия, астенотератоспермия, криптоспермия, олигоастеноспермия, олиготератоспермия, олиго-спермия, тератоспермия.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2 Оборудование и безопасность

А2.1 Оснащение андрологической лаборатории

Ниже представлен список расходных материалов и оборудования, необходимых в андрологической лаборатории для выполнения основных тестов, описанных в данном Руководстве.

Консультируйтесь с научной литературой, ссылки на которую даны в Руководстве, или если необходимо, с любым найденным источником.

А2.1.1 Лаборатории следует иметь следующее базовое оборудование и расходные материалы:

- весы;
- столы с непромокаемой рабочей поверхностью;
- контейнеры:
 - для одноразовых игл и острых материалов;
 - для опасных отходов;
- копию Руководства по биологической безопасности (WHO, 2004);
- замораживатель;
- дезинфицирующее средство или гипохлорид натрия, 0.1% (v/v) и 1% (v/v) раствор на дистиллированной воде;
- дезинфицирующее мыло или антисептический гель для кожи;
- одноразовые перчатки;
- раствор для промывания глаз;
- аптечка первой помощи;
- вытяжной шкаф для хранения и работы с токсичными реагентами и химикатами или красителями;
- холодильник;
- душ.

А2.1.2 Следующие расходные материалы и оборудование необходимы для проведения семиологического анализа:

- капиллярные трубочки и уплотнитель (для анализа пенетрации сперматозоидов в цервикальную слизь);
- анализатор CASA (опционально);
- центрифуги:
 - центрифуга, способная достигать 300–500g (для рутинного манипулирования со спермой и мочой), 1000g (для маркеров спермы) и 2000g (для вязких образцов спермы);
 - высокоскоростная центрифуга, достигающая 3000g (для работы с образцами спермы при азооспермии), или миницентрифуга, дости-

гающая 16 000g (для получения образцов семенной плазмы, освобожденных от сперматозоидов) (см. Бокс A2.1);

- оборудование для криоконсервации (опционально);
- презервативы: без спермицидной смазки, нетоксичные (опционально);
- сосуды для разбавления растворов;
- диссекционный микроскоп (опционально; для сбора ооцитов хомячков);
- фильтровальная бумага, 90 г/м²;
- флуоресцентный микроскоп и объективы (опционально; для высокочувствительных измерений концентрации сперматозоидов и теста на акросомную реакцию);
- гемоцитометры: улучшенный гемоцитометр Нэйбауера или аналогичный, 100 мкм глубиной с тонкими покровными стеклами (толщина номер 4, 0.44 мм);
- инкубатор (37° C), предпочтительно с 5% (v/v) CO₂ (опционально);
- лабораторная пленка: самогерметизирующаяся, формуемая;
- лабораторный многокнопочный счетчик (шесть или девять кнопок);
- счетная камера большого объема (опционально; для оценки эякулята с низкой концентрацией сперматозоидов);
- люминометр (опционально; для анализа свободных радикалов кислорода, ROS);
- предметные стекла для микроскопии:
 - со шлифованным краем или поверхностью для записи и покровные стекла (толщина номер 1.5, 0.16–0.19 мм);
 - простые предметные стекла для растяжения капли спермы на другое предметное стекло при создании мазков;
- карандаши/ручки:
 - для написания на покрытых инеем предметных стеклах; подходит карандаш с графитом мягкости HB (американский стандарт номер 2);
 - восковой/масляный карандаш (карандаш для разлиновки — опционально; для разграничения области раствора антитела на предметном стекле);
 - перманентный фломастер;
- pH-метр (ISFET) (опционально; для вязких образцов спермы);
- pH-бумага (диапазон 6–10);
- фазово-контрастный микроскоп (для оценки концентрации сперматозоидов, подвижности, морфологии) с источником света минимум 50 Вт и соответствующими аксессуарами (см. Приложение 3):
 - положительно-контрастные объективы ×10, ×20 (или ×25), ×40 (или ×63), ×100 иммерсионный объектив;
 - отрицательно-контрастный объектив ×40 (опционально; для теста на жизнеспособность с эозином);
 - окуляр с широким полем ×10 (или ×12.5);

- окулярная сетка (для оценки области, используемой для расчета подвижности);
- фазовый микрометр (для оценки морфологии сперматозоидов);
- английский видеоискатель (предметное стекло с сеткой — опционально; для обеспечения качества расчетов);
- нагревательная поверхность (опционально; для определения скорости сперматозоидов);
- пипетки и наконечники для пипеток:
 - пипетки Пастера с латексными кончиками или пластиковые одноразовые пипетки или автоматические пипетки для перемешивания спермы;
 - пипетки с воздушным замещением;
 - пипетки с положительным замещением с объемом 10–100 мкл;
- формы для записи результатов семиологического анализа и взаимодействия сперматозоидов со слизью (см. Приложение б);
- миксеры:
 - двухмерный шейкер или ротационное колесо для перемешивания образцов спермы (опционально);
 - вортекс для разжиженных образцов спермы;
- герметизирующая лента для 96-луночных планшетов (опционально; для анализа на содержание фруктозы);
- контейнеры для сбора спермы:
 - одноразовые контейнеры с широким горлом и пробкой;
 - автоклавируемые стеклянные цилиндры;
- камеры для предметных стекол, одноразовые (опционально; для приготовления образца для расчета подвижности, для контроля качества);
- спектрофотометр (опционально; для биохимического анализа эякулята);
- пластинка с лунками, фарфоровая или из боросиликатного стекла (для проведения теста с эозин-нигрозинном);
- секундомер (опционально; для приготовления образцов для контроля качества);
- папиросная бумага: безворсовая;
- нагревательная поверхность: настольная (опционально; для предварительного нагрева предметных стекол при оценке подвижности).

A2.1.3 Могут потребоваться следующие химические вещества:

- антитела (CD45 для лейкоцитов);
- антигенный агент (опционально; для приготовления образца для контроля качества);
- набор клеточной пероксидазы (опционально);
- среда для криоконсервации (опционально);
- градиент плотностей (среда для обработки спермы);

- набор для оценки содержания фруктозы (опционально);
- глутаральдегид (опционально; для теста НОР);
- минеральное масло (опционально; для теста НОР);
- набор для оценки нейтральной α -глюкозидазы (опционально);
- краситель по Папаниколау;
- вазелин (опционально; для теста НОР);
- набор для быстрого окрашивания (опционально; для оценки морфологии сперматозоидов);
- воск (температура плавления 48–66°С) (опционально; для теста НОР);
- набор для оценки содержания цинка (опционально).

Бокс А2.1 Вычисление силы центрифугирования

Сила, которой сперматозоиды подвергаются во время центрифугирования (относительная центростремительная сила, relative centrifugal force, RCF), зависит от скорости вращения (N , число оборотов в минуту, r.p.m.) и расстояния от центра ротора до точки, в которой сила должна быть измерена (обычно дно центрифужной пробирки) (радиус, R , см). Относительную центростремительную силу рассчитывают по формуле $1,118 \times 10^{-5} \times R \times N^2$. Например, при радиусе ротора 8,6 см центрифугирование при 5000 оборотах в минуту будет создавать силу 2404 g, при радиусе ротора 13,5 см центрифугирование при 3900 оборотах в минуту создает силу 2296 g. Рис. А2.1 является номограммой для определения относительной центростремительной силы в зависимости от радиуса ротора и скорости вращения.

А2.2 Потенциальные риски в андрологической лаборатории

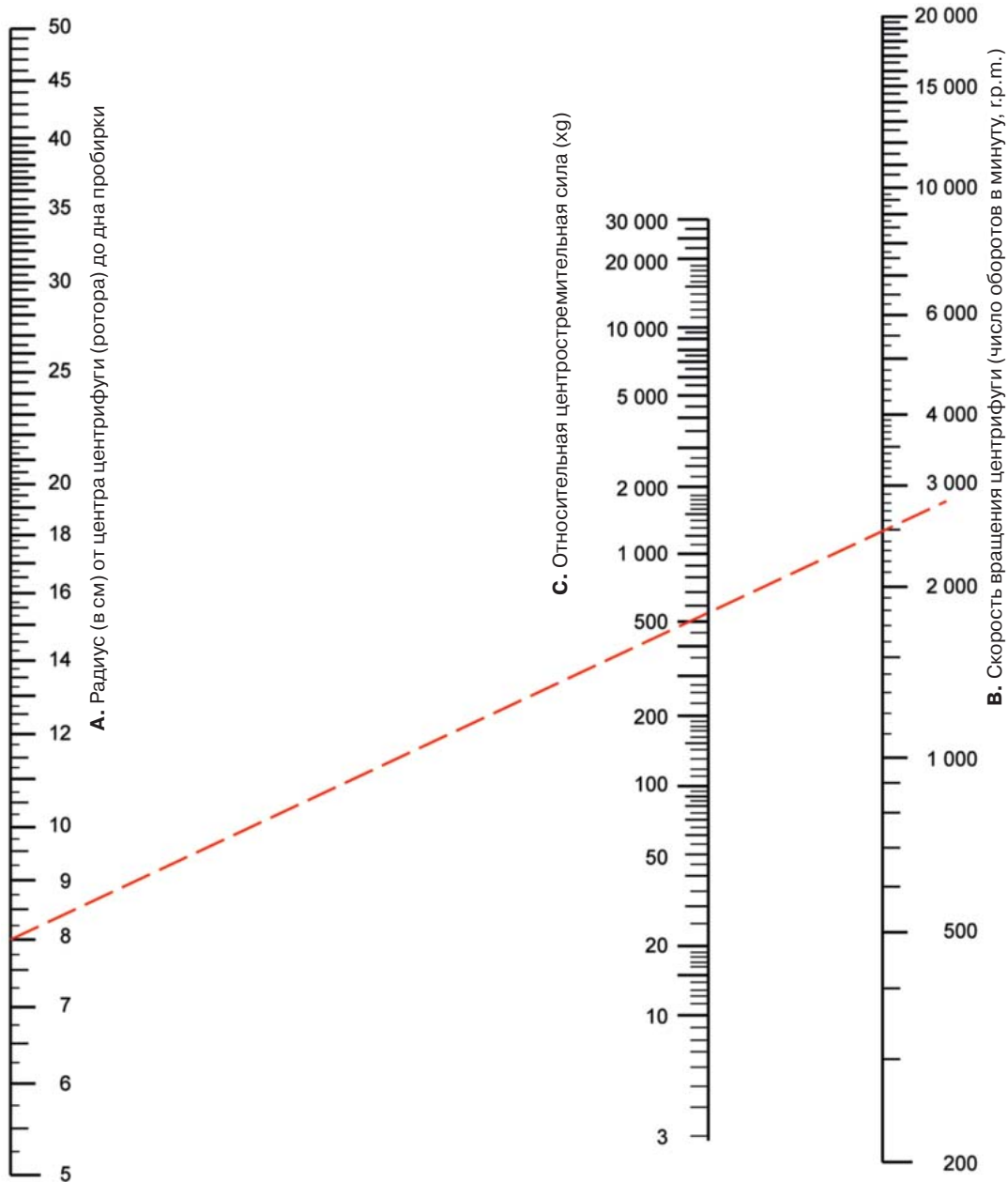
Жидкости тела человека, такие как сперма, потенциально инфекционно опасны и с ними следует работать с особой осторожностью. В андрологической лаборатории самые опасные инфекционные микроорганизмы, которые могут содержаться в эякуляте, это ВИЧ и вирусы гепатита В и С (HBV и HCV). Лабораторному персоналу следует обращаться со всеми биологическими образцами как с потенциально зараженными и быть предельно осторожными при работе с ними.

А2.3 Безопасность лабораторного персонала

- Весь лабораторный персонал, который работает с образцами жидкостей человека, должен быть вакцинирован против гепатита В.
- Нельзя принимать пищу, пить, курить, использовать косметику или хранить пищевые продукты в андрологической лаборатории.
- Нельзя пипетировать ртом. Всегда следует использовать приборы для механического пипетирования при манипуляциях с жидкостями.
- Весь лабораторный персонал должен носить одноразовые халаты и снимать их при выходе из лаборатории. Лабораторный персонал дол-

Рис. А2.1 Номограмма (расчетный график) для определения относительной центробежной силы, исходя из радиуса ротора и скорости вращения

Прямая линия, соединяющая радиус ротора (см, левая ось) и скорость вращения (оборотов в минуту, правая ось), пересекает среднюю ось в точке относительной центробежной силы. В примере при радиусе 8 см при скорости вращения 2500 оборотов в минуту относительная центробежная сила приблизительно равна 550 g (точное расчетное значение равно 559 g, см. Бокс А2.1).



жен использовать одноразовые перчатки (резиновые, латексные или пластиковые, опудренные или нет), особенно при работе с нативным или замороженным эякулятом или семенной плазмой или другими биологическими образцами и при контакте со всеми контейнерами, содержащими образцы. Перчатки следует снимать и выбрасывать при уходе из лаборатории, при взятии телефонной трубки или использовании компьютера. Перчатки нельзя использовать повторно.

- Персонал должен регулярно мыть руки, особенно перед уходом из лаборатории, при работе с образцами и после снятия перчаток и халата.
- Строгие меры предосторожности должны быть применены для того, чтобы избежать случайного ранения инструментами, которые были в контакте с эякулятом и контакта эякулята с незащищенной кожей, а также порезами, ссадинами и повреждениями на коже.
- Измерения следует проводить так, чтобы избежать разбрызгивания и пролития образцов спермы, крови или мочи.
- Все острые предметы (иглы, лезвия и т. д.) следует собирать в маркированный контейнер после использования. Этот контейнер необходимо запечатывать, не дожидаясь полного заполнения, и утилизировать аналогично другим опасным лабораторным предметам.
- Все потенциально зараженные лабораторные предметы (перчатки, контейнеры со спермой) следует собирать и утилизировать соответствующим образом.
- Следует носить маски для лица при манипуляциях, при которых потенциально могут создаваться аэрозоли или капли, то есть при перемешивании и центрифугировании в открытых контейнерах. Не следует насильно выдавливать последние капли эякулята из пипеток, так как это может привести к образованию аэрозолей и более мелких капель.
- Персоналу следует носить защитные очки для глаз, перчатки и закрытую обувь, когда это необходимо, например, при работе с жидким азотом (см. Раздел А.2.5).

A2.4 Безопасность лабораторного оборудования

Рабочие поверхности и многоразовые контейнеры, которые находились в контакте с эякулятом или другими биологическими образцами, следует стерилизовать или дезинфицировать. Должны быть выполнены следующие процедуры.

Ежедневно, после завершения выполнения анализа необходимо:

- Вымыть рабочие поверхности дезинфицирующим раствором, например гипохлоридом натрия 0,1% (1 г/л) или его аналогом, подождать не меньше 1 ч (или всю ночь), затем смыть дезинфицирующий раствор водой.
- Замочить счетные камеры и покровные стекла в растворе гипохлорида натрия 0,1% (1 г/л) или аналогичного дезинфицирующего раствора на ночь. Отмывайте дезинфицирующий раствор водой.

При пролитии образца.

- Если внешняя поверхность контейнера стала контаминирована, отмойте ее дезинфицирующим раствором, например гипохлоридом натрия 0,1% (1 г/л) или аналогом, затем смойте его водой.
- Если пролилась любая биологическая жидкость, сразу же обработайте рабочую поверхность дезинфицирующим средством, например гипохлоридом натрия 1,0% (10 г/л) или аналогом, подождите не меньше 4 ч, затем смойте раствор водой.

При работе с ВИЧ-инфицированными образцами спермы выполняют тепловую инактивацию.

- Суховоздушная стерилизация в течение 2 ч при температуре 170°C (340°F). Накройте контейнер фольгой, чтобы избежать охлаждения до начала работы.
- Стерилизация паром (автоклавирование) в течение 20 мин при температуре 121°C (250°F) при давлении 101кПа (15 psi или 1 атм) выше атмосферного.
- Продолжительное кипячение в течение 20–30 мин.

A2.5 Безопасность и меры предосторожности при работе с жидким азотом

- Манипуляции с жидким азотом опасны. Всегда работайте с ним аккуратно, используйте только сертифицированные емкости и не пытайтесь плотно закрыть сосуды. Используйте щипцы для извлечения образцов, погруженных в жидкий азот.
- Защищайте глаза специальным экраном или защитными очками. Защищайте руки просторными сухими кожаными или изоляционными перчатками. Носите закрытую обувь.
- Если жидкий азот проливается на поверхность, он распространяется на большой площади, и поэтому охлаждает большие области. Объекты мягкие и гибкие при комнатной температуре становятся жесткими и хрупкими при температуре жидкого азота.
- Экстремально низкая температура может нанести серьезный вред. При попадании на кожу азот может вызвать ожог. Газ, выпускаемый из сосуда с жидким азотом, очень холодный. Слизистые оболочки, такие как у глаза, могут повреждаться даже при недлительном контакте с газом, который не воздействует на кожу лица и руки.
- Дождитесь прекращения бурления и разбрызгивания жидкого азота, а также выделения холодного газа. Бурление и разбрызгивание всегда происходят, когда наполняется теплый контейнер или объекты не уравновешены в азоте. Всегда выполняйте манипуляции медленно для минимизации бурления и разбрызгивания.
- Избегайте контакта с неизолированными трубками с жидким азотом. Никогда не прикасайтесь никакой частью тела к неизолированным трубкам и сосудам, содержащим жидкий азот. Экстремально холодный металлический стержень может воткнуться быстро, и будут нанесены повреждения на тело при попытке достать стержень.
- Работайте в хорошо проветриваемых помещениях. Небольшое количество жидкого азота формирует большое количество газа (при комнатной температуре девять объемов газа на один объем жидкости). Если газ испаряется из жидкого азота в закрытом помещении, процент кислорода в воздухе может снизиться и возникнет риск удушья. Коммерчески доступны кислородные датчики, которые предупреждают, когда

уровень кислорода падает ниже 17% (v/v), их следует использовать при хранении жидкого азота.

- Используйте только соломины и стразы, специально изготовленные для замораживания в жидком азоте. Соблюдайте осторожность всегда, даже при работе с ними, так как и они могут взорваться при оттаивании.

Литература

WHO (2004). Laboratory biosafety manual, 3rd ed. Geneva, World Health Organization (<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546506.pdf>, last accessed 25 February 2010).

ПРИЛОЖЕНИЕ 3 Микроскопия

Наилучшим источником информации по конкретному микроскопу служит руководство пользователя, которое включает описание всех частей прибора. Если такое руководство недоступно, возможно получить информацию о настройке микроскопа и его использовании в сети Интернет.

Для методов оценки эякулята, описанных в данном Руководстве, рекомендуется использовать фазово-контрастный микроскоп. Микроскоп с источником света не ниже 50 Вт, предпочтительно бинокулярный (имеет два окуляра), с фазовым конденсором и фазовыми объективами $\times 10$, $\times 20$ (или $\times 25$) и $\times 40$ (или $\times 63$) (для общей оценки, подвижности, жизнеспособности и подсчета сперматозоидов и клеток эякулята, отличных от половых), а также световой иммерсионный объектив $\times 100$ (для оценки морфологии и жизнеспособности сперматозоидов). Линзы с отрицательным фазовым контрастом могут понадобиться для анализа жизнеспособности и некоторых модулей CASA, а флуоресцентные линзы (фильтры) необходимы для флуоресцентной микроскопии.

- Качество и стоимость объективов широко варьирует (см. Бокс А.3.1). Более дорогие объективы дают более хорошее изображение, но и недорогие объективы могут быть пригодны.
- Сетки на окуляр (сетки, координатные сетки, микрометры) представляют собой стеклянные диски со шкалой, известного размера, обычно 5 или 10 мм, или сетки различных форм, покрытые шкалами. Некоторые окуляры имеют нанесенную расчетную сетку; другие могут откручиваться для вставки сеток. Сетки доступны различных диаметров, что позволяет добиться совмещения сетки и окуляра. Их можно откалибровать с помощью микрометра предметного столика для определения размеров сперматозоида. Также их можно использовать для ограничения поля зрения при оценке подвижности сперматозоидов. Одна из сеток, показанная на Рис. 2.4(а) и Рис. А7.4(а), имеет размер 5×5 мм, что является хорошим размером для оценки подвижности сперматозоидов при увеличении как $\times 20$, так и $\times 40$. Некоторые исследователи предпочитают сетки размером 10×10 мм для оценки концентрации и морфологии сперматозоидов.
- Микрометр для предметного столика — модифицированное предметное стекло для микроскопии со шкалой, нанесенной на его поверхность, обычно 1 мм, поделенный на отрезки по 10 мкм. Микрометр предметного столика используют для калибровки микрометра окуляра или координатной сетки и измерения расстояний, например, для расчета подвижности (см. Рис. А7.5).

Процедура, описанная ниже, обеспечит наилучшее изображение с микроскопа. Если поток света как следует выровнен и отрегулирован, изображение будет четким, резким и, вероятно, не вызовет напряжение глаз. Следующую процедуру необходимо выполнить при использовании нового микроскопа или если получено изображение плохого качества.

А3.1 Размещение образца

- Поместите 10 мкл эякулята (или другой объем, см. Бокс 2.4) на предметное стекло, накройте покровным стеклом размером 22 мм x 22 мм (толщина номер 1,5, 0,17 мм) (или другого размера, см. Бокс 2.4) и установите препарат на предметный столик. Вы также можете использовать микрометр предметного столика вместо предметного стекла с эякулятом для калибровки микроскопа.
- Включите освещение и настройте его интенсивность так, чтобы получить максимальный контраст, при этом комфортный для глаз.
- Выберите положительно-фазовый объектив x10. Вращайте конденсор до совпадения мощности с выбранным объективом.

Важно: Если микроскоп представляет собой тринокуляр (т. е. имеет третий окуляр, к которому присоединена фото- или видеокамера), будет существовать дополнительный световой регулятор, который в большинстве случаев располагается справа от окуляра. Этот регулятор имеет три положения: первое позволяет всему световому потоку попадать только в окуляр, второе положение направляет весь поток света в камеру и третье — дефектное, когда половина потока света попадает в окуляр, а половина в камеру.

Бокс А.3.1 Объективы

Каждая линза микроскопа имеет нанесенную на нее информацию, такую как:

UPlanFI	PlanApo	Plan Neofluor	Plan	S Fluor
20x/0,80 imm corr	40x/0,75 Ph2	100x/1,35 oil iris	100x/1,25 oil Ph3	20x/0,75
160/0,17	$\infty/0,17$	$\infty/-$	$\infty/0,17$ WD 1,0	

Объяснение различных маркировок дано ниже.

Plan: плоская линза (planar), обеспечивающая плоское поле зрения, когда все объекты находятся в фокусе.

Apo: апохроматическая линза (apochromatic), которая необходима для корректировки аберрации красителей.

F, FI, FL, Neofluor, Fluor, Fluotar, UV, S-Fluor: линзы, которые пропускают ультрафиолетовый свет и используются в флуоресцентной микроскопии.

100x, x63, 40x и т. д.: увеличение линзы.

0,30, 0,50, 0,80, 1,30, 1,40 и т. д.: числовая апертура линзы. Указывает на способность линзы к световому накоплению. Вместе с используемой длиной волны (λ , лямбда) числовая апертура определяет разрешение (кратчайшее расстояние между объектами, которые можно различить). Числовая апертура = $\eta \times \sin\alpha$, где η (эта) — показатель преломления иммерсионной среды, а α (альфа) — угол между краем конуса освещения и вертикальной осью. Так как максимальное значение $\sin\alpha$ равно 1, максимум числовой апертуры теоретически равен η , однако на практике максимальное значение равно 1,4. Выбирайте линзы с самой высокой числовой апертурой для наилучшего разрешения.

Ph, Ph1, Ph2, Ph3, NP, N: указывает, что линзы имеют фазовое кольцо. Ph — положительные фазовые кольца, NP или N — отрицательная фаза. Ph1, Ph2 и Ph3 — каждая линза требует различные фазовые кольца в конденсоре. Оптика с положительным фазовым контрастом позволяет наблюдать внутриклеточные структуры (используется при влажных препаратах и для расчета подвижности). При этом негативный фазовый контраст дает белое изображение на темном фоне (используется на влажных препаратах для расчета жизнеспособности и CASA).

Imm, immersion, oil, W: указывает на линзы, разработанные для работы с жидкостями — чаще всего с маслом, водой (W) или глицерином — между объектом и линзой для обеспечения более четкого изображения (если не указано обратное, линза считается «сухой» и не следует использовать никакую жидкость).

Iris: указывает на линзу с ирисом, управляемую кольцом.

Corr: указывает на линзу с нанесенным коррекционным кольцом, которое позволяет использовать иммерсионную среду с различными индексами преломления.

160, ∞: длина трубки или расстояние между окуляром и объективом. Обычно составляет 160 мм, однако в современных линзах может быть равно бесконечности (∞).

0.17, — : толщина покровного стекла, необходимого для объектива. Покровные стекла номер 1,5 (толщина 0,16–0,19 мм) являются универсальными и пригодны для большинства исследовательских задач. Гемоцитометр требует покровных стекол номер 4 (толщина 0,44 мм). Знак «—» означает, что толщина покровного стекла неважна или что иммерсионная среда может быть добавлена непосредственно на предметное стекло.

WD: рабочее расстояние; расстояние от переднего элемента линзы объектива до ближайшей поверхности покровного стекла, где образец находится в фокусе. Рабочее расстояние в общем случае снижается с повышением увеличения и числовой апертуры, рабочее расстояние может быть нормальным (до 5 мм), длинным (5.25–9.75 мм), экстра длинным (10–14 мм) и супер длинным (15–30 мм). Некоторые микроскопы могут использовать линзы с длинным рабочим расстоянием при работе с улучшенной камерой Нэйбауера.

Показатель преломления: величина фазового преломления света при его прохождении через среду. Показатель преломления (RI, η , eta — эта) вакуума равен 1,0000, воздуха — приблизительно 1,0 (1,0008), воды — 1,33, глицерина — 1,47, а большинства иммерсионных масел — 1,515. Установочная среда после высыхания имеет сходный показатель преломления (1,488–1,55) с показателем стекла (1,50–1,58).

А3.2 Настройка окуляров

Настройте расстояние между окулярами по своим глазам, сдвигая и раздвигая окуляры.

А3.3 Фокусировка изображения

- Поверните грубую настройку фокуса для того, чтобы приблизить объективы $\times 20$ или $\times 40$ к объекту как можно ближе. Во избежание поломки объектива и предметного стекла смотрите на объектив при его смещении вниз и на предметный столик или предметное стекло, но не в окуляры. Используйте грубый фокус для настройки высоты объектива так, чтобы предметное стекло почти соприкасалось с объективом.
- Посмотрите в оба окуляра, медленно поворачивая регулятор грубой настройки и двигаясь постепенно от объекта до тех пор, пока образец не окажется в слабом фокусе. Используйте регулятор точной настройки для достижения лучшего фокуса.

Важно: Если фокус трудно определить, попробуйте сфокусироваться на конце предметного стекла, чтобы оказаться ближе к необходимой фокусируемой плоскости.

А3.4 Фокусировка окуляров

- У некоторых микроскопов окуляры могут настраиваться независимо. У других один окуляр фиксирован, а второй можно сфокусировать.
- Настраиваемые окуляры обычно промаркированы шкалой «+ / 0 / -». Установите окуляры в положение «0» до начала настройки.
- Если один из окуляров фиксирован, смотрите только через фиксированный окуляр (закройте или прикройте один глаз).
- Сфокусируйте изображение образца с использованием регулятора тонкой настройки фокуса. Проще сфокусироваться на неподвижном объекте, например на мертвом сперматозоиде, частичке пыли или сетке микрометра на предметном столике.
- Фокусируйте настраиваемый окуляр, смотря через него, закрыв или прикрыв один глаз или фиксированный окуляр. Вращайте колесо окуляра от базового положения в «+» или «-» до тех пор, пока фокус не будет подходящим.

А3.5 Фокусировка светового конденсора

- Закройте полевую диафрагму (над источником света у основания микроскопа).
- Поднимайте или опускайте конденсор, используя небольшие винты на левой или правой стороне конденсора, до тех пор, пока края диафрагмы не приобретут резкий (четкий) контур, а кольцо света станет —

маленьким и четким. Эта позиция будет в общем случае достижима, когда конденсор находится в самом верхнем положении. Края светового пятна могут меняться от голубого до красного, так как конденсор сфокусирован (хроматическая аберрация), а края конденсора будут оставаться немного размытыми. Свет может быть как центрирован, так и нет.

Важно: Если апертура поля не имеет ирисовую диафрагму, фокусируйтесь на резкость объекта (то есть карандашная точка), помещенного в световое поле.

А3.6 Центрирование конденсора

- Центрируйте полевую диафрагму с помощью регулятора центрирования конденсора. Обычно есть два (часто с насечками) регулятора, расположенных диагонально, спереди или снизу конденсора.
- Как только световое изображение отцентрировано, откройте полевую диафрагму так, чтобы свет падал на поле в виде точки. Не открывайте область диафрагмы за эту точку.
- Закрывайте апертуру конденсора до тех пор, пока не исчезнет яркий свет.

Важно: Сразу за правым регулятором центровки находятся небольшие шурупы, которые фиксируют конденсор. Будьте аккуратны, не поворачивайте их, когда центрируете конденсор, так как их ослабление может вызвать выпадение конденсора из микроскопа.

А3.7 Регулировка фазовых колец

- Процедуру можно сделать с использованием центрирующего телескопа, доступного у производителя микроскопа.
- Вставьте подходящее фазовое кольцо в конденсор с соответствующим объективом.
- Удалите один окуляр и замените его центрирующим телескопом. Сфокусируйте кольцо центрирующего телескопа, удержанием основания одной рукой и вращением вверх другой рукой, пока не увидите сквозь него изображение. Поворачивайте до тех пор, пока два кольца не будут точно в фокусе: одно кольцо темное (фазовое кольцо), а другое — светлое (световое кольцо).
- Откалибруйте кольца таким образом, чтобы они были концентрическими, путем вращения регулятора настройки фазы, расположенного на фазовом конденсоре. Эти регуляторы обычно расположены сзади конденсора.
- Замените центрирующий телескоп окуляром микроскопа.

А3.8 Флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентная микроскопия используется для анализа ядер сперматозоидов при процедуре подсчета с использованием красителя Hoechst 33342 (см. Раздел 2.11.2) и при оценке акросомной реакции с использованием метки фитогемагглютинаина FITC (см. Раздел 4.4.1). Спектральный максимум красителя Hoechst 33342 и FITC составляет 346 нм и 494 нм, соответственно, и соответствующий максимум эмиссии — 460 нм и 520 нм. Флуоресцентные линзы необходимы (см. Бокс А3.1). Каждая модель микроскопа будет их иметь как опциональное оборудование при покупке, потребуется набор дихроичных зеркал и барьерных фильтров для оценки вышеназванных красителей.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4 Приготовление основных растворов

Для приготовления всех растворов требуется дистиллированная вода (дистиллированная, дважды дистиллированная или деионизированная).

А4.1 Раствор BWW (Biggers, Whitten, Whittingham)

BWW основной раствор (Biggers et al., 1971)

1. К 1000 мл дистиллированной воды добавить 5,54 г хлористого натрия (NaCl), 0,356 г хлористого калия (KCl), 0,294 г гептагидрата сульфата магния ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 0,250 г дигидрата хлористого кальция ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) и 0,162 г дигидрата фосфата калия (KH_2PO_4).
2. Доведите pH до 7.4 с помощью 1 моль/л гидроксида натрия (NaOH).
3. Добавьте 1,0 мл (0,04%, 0,4 г/л) фенола красного на литр раствора.

Важно: Этот раствор может храниться в течение нескольких недель при температуре 4°С.

BWW рабочий раствор.

Для использования в течение 1 дня:

1. Смешайте 100 мл основного раствора с 210 мг бикарбоната натрия ($NaHCO_3$), 100 мг D-глюкозы, 0,37 мл 60% (v/v) сиропа лактата натрия, 3 мг пуривата натрия, 350 мг фракции V альбумина бычьей сыворотки, 10 000 единицами пенициллина и 10 мг сульфата стрептомицина.
2. Нагревайте при 37°С до использования в атмосфере 5% (v/v) CO_2 , 95% (v/v) воздуха.

Важно 1: Для инкубации на воздухе: добавьте 20 ммоль/л раствора Нерес (соль Na:5,21 г/л) и уменьшите содержание $NaHCO_3$ до 0,366 г/л.

Важно 2: Для градиента плотностей (см. Раздел 5.5.1): подготовьте 10-кратный концентрированный основной раствор, используя 10 раз компоненты раствора по весу за исключением фенола красного. После приготовления градиента добавьте 100 мл, как указано выше.

А4.2 Фосфатно-солевой буфер Дульбеко (PBS)

1. PBS: к 750 мл дистиллированной воды добавить 0.2 г хлорида калия (KCl), 0,2 г дигидрата фосфата калия (KH_2PO_4), 0,1 г гексагидрата хлорида магния ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 8,0 г хлорида натрия (NaCl), 2,16 г гептагидрата фосфата натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) и 1,00 г D-глюкозы.
2. Растворите 0.132 г дигидрата хлорида кальция ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) в 10 мл дистиллированной воды и медленно добавляйте раствор, описанный выше, перемешивая.

3. Доведите pH до значения 7,4 с помощью 1 моль/л гидроксида натрия (NaOH).
4. Доведите объем до 1000 мл, добавив дистиллированную воду.

Важно 1: Для предотвращения выпадения осадка: добавьте отдельно CaCl_2 , медленно с перемешиванием.

Важно 2: Если необходимо, добавьте 0,3 г бычьего сывороточного альбумина (BSA) (без жирной кислоты) на 100 мл до использования.

A4.3 Среда Эрла

1. К 750 мл дистиллированной воды добавить 6,8 г хлорида натрия (NaCl), 2,2 г бикарбоната натрия (NaHCO_3), 0,14 г дигидрофосфата натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0,4 г хлорида калия (KCl), 0,20 г гептагидросульфата магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и 1,0 г D-глюкозы.
2. Растворите 0,20 г безводного хлорида кальция (CaCl_2) медленно в вышеназванном растворе, перемешивая.
3. Установите pH 7,4 с помощью 1 моль/л соляной кислотой (HCl) или 1 моль/л гидроксида натрия (NaOH).
4. Доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой.

Важно 1: Для инкубации на воздухе: добавьте 20 ммоль/л среды Heres (соль натрия: 5,21 г/л) и уменьшите содержание NaHCO_3 до 0,366 г/л.

Важно 2: Для градиента плотностей (см. Раздел 5.5.1): подготовьте 10-кратный концентрированный основной раствор, используя 10 раз компоненты раствора по весу за исключением бикарбоната. После приготовления градиента добавьте 100 мл с 0,22 г NaHCO_3 .

A4.4 Среда F-10 (Ham's F-10 medium)

1. К 750 мл дистиллированной воды добавить 7,4 г хлорида натрия (NaCl), 1,2 г бикарбоната натрия (NaHCO_3), 0,285 г хлорида калия (KCl), 0,154 г фосфата натрия (Na_2HPO_4), 0,153 г гептагидросульфата магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,083 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4), 0,044 г дигидрохлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 1,1 г D-глюкозы.
2. Довести pH до значения 7,4 с помощью 1 моль/л гидроксида натрия (NaOH).
3. Довести объем раствора до 1000 мл с помощью дистиллированной воды.

Важно 1: Для инкубации на воздухе: добавьте 20 ммоль/л среды Heres (соль натрия: 5,21 г/л) и уменьшите содержание NaHCO_3 до 0,366 г/л.

Важно 2: Для градиента плотностей (см. Раздел 5.5.1): подготовьте 10-кратный концентрированный основной раствор, используя 10 раз

компоненты раствора по весу за исключением бикарбоната. После приготовления градиента добавьте 100 мл с 0,12 г NaHCO_3 .

А4.5 Сбалансированный солевой раствор Хэнкса

1. К 750 мл дистиллированной воды добавить 8,0 г хлористого натрия (NaCl), 0,35 г бикарбоната натрия (NaHCO_3), 0,4 г хлористого калия (KCl), 0,185 г дигидрата хлористого кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,1 г гексагидратхлорида магния ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,1 г гептагидратсульфата магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,06 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4), 0,048 г дигидрата фосфата натрия (NaH_2PO_4) и 1,0 г D-глюкозы.
2. Довести pH до значения 7,4 с помощью 1 моль/л гидроксида натрия (NaOH).
3. Довести раствор до 1000 мл с помощью дистиллированной воды.

А4.6 Трубная жидкость человека

Оригинальная редакция (Quinn et al., 1985):

1. К 750 мл дистиллированной воды добавить 5,931 г хлорида натрия (NaCl), 0,35 г хлорида калия (KCl), 0,05 г гептагидрата сульфата магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,05 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4), 2,1 г бикарбоната натрия (NaHCO_3), 0,5 г D-глюкозы, 0,036 г пирувата натрия, 0,3 г дигидратхлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 4,0 г DL-лактата натрия (60% (v/v) сироп).
2. К 1 мл выше приготовленной смеси добавить 10 мкг фенола красного, 100 МЕ пенициллина и 50 мкг сульфата стрептомицина.
3. Довести pH до значения 7,4 с помощью 1 моль/л соляной кислоты (HCl).
4. Довести объем раствора до 1000 мл с помощью дистиллированной воды.

Важно 1: Для инкубации на воздухе: добавьте 20 ммоль/л среды Нерес (соль натрия: 5,21 г/л) и уменьшите содержание NaHCO_3 до 0,366 г/л.

Важно 2: Для градиента плотностей (см. Раздел 5.5.1): подготовьте 10-кратный концентрированный основной раствор, используя 10 раз компоненты раствора по весу за исключением бикарбоната, пирувата и лактата. После приготовления градиента добавьте 100 мл с 0,21 г NaHCO_3 , 0,0036 г пирувата натрия и 0,4 г лактата натрия.

А4.7 Среда Кребса — Рингера

Среда Кребса — Рингера (KRM) без фенола красного:

1. К 750 мл дистиллированной воды добавить 6,9 г хлорида натрия (NaCl), 2,1 г бикарбоната натрия (NaHCO_3), 0,35 г хлорида калия (KCl),

0,32 г дигидрата хлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,18 г дигидрата дигидрофосфата натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,1 г гексагидрата хлорида магния ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) и 0,9 г D-глюкозы.

2. Довести pH до значения 7.4 с помощью 1 моль/л гидроксида натрия (NaOH).
3. Довести раствор до 1000 мл с помощью дистиллированной воды

A4.8 Трибуферная соль (TBS)

1. К 750 мл дистиллированной воды добавить 6,055 г трисбуферной соли (Tris base) и 8,52 г хлористого натрия (NaCl).
2. Довести pH до значения 8,2 с помощью 1 моль/л соляной кислоты (HCl).
3. Довести раствор до 1000 мл с помощью дистиллированной воды.

Важно: 10-кратный концентрированный основной раствор может быть сделан при использовании 10-кратного увеличения веса компонентов. Для использования разведите в 10 раз дистиллированной водой и доведите pH с помощью 1 моль/л соляной кислоты (HCl).

A4.9 Раствор Тироде

1. К 750 мл дистиллированной воды добавить 0,2 г безводного хлорида кальция (CaCl_2), 0,2 г хлорида калия (KCl), 0,05 г гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4), 0,2 г гексагидрата хлорида магния ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 8,0 г хлорида натрия (NaCl), 1,0 г бикарбоната натрия (NaHCO_3) и 1,0 г D-глюкозы.
2. Довести pH до значения 7,4 с помощью 1 моль/л соляной кислоты (HCl) или 1 моль/л гидроксида натрия (NaOH).
3. Довести раствор до 1000 мл с помощью дистиллированной воды.
4. Если необходимо, добавить 0,3 г BSA (без жирных кислот) на 100 мл до использования.

A4.10 Краситель по Папаниколау

Коммерчески доступные наборы для окрашивания дают хороший результат, однако краситель можно приготовить в условиях лаборатории.

Важно: Проверяйте кислотность дистиллированной воды до приготовления различных концентраций этанола. Следует придерживаться значения pH, равного 7,0.

Краситель EA-36 (эквивалент EA-50)

Компоненты

1. Эозин Y (цветовой показатель 45380) 10 г

2. Бисмарк коричневый Y (цветовой показатель 21000)	10 г
3. SF светло-зеленый, желтоватый (цветовой показатель 42095)	10 г
4. Дистиллированная вода	300 мл
5. Этанол 95% (v/v)	2000 мл
6. Фосфовольфрамовая кислота	4 г
7. Насыщенный раствор углекислого лития (>1,3 г/100 мл)	0,5 мл

Основные растворы

Отдельно приготовить 10% (100 г/л) растворы каждого красителя следующим образом:

1. Растворите 10 г эозина Y в 100 мл дистиллированной воды.
2. Растворите 10 г Бисмарка коричневого Y в 100 мл дистиллированной воды
3. Растворите 10 г SF светло-зеленый, желтоватый в 100 мл дистиллированной воды

Приготовление

1. Для приготовления 2 л красителя смешайте 50 мл основного раствора эозина Y с 10 мл основного раствора Бисмарка коричневого Y и добавьте 12,5 мл основного раствора красителя SF светло-зеленый, желтоватый.
2. Доведите объем до 2000 мл 95% (v/v) этанолом.
3. Добавьте 4 г фосфовольфрамовой кислоты.
4. Добавьте 0,5 мл насыщенного раствора углекислого лития.
5. Хорошо перемешайте и храните при комнатной температуре в плотно закрытом сосуде из темного стекла.

Важно 1: Раствор сохраняет стабильность в течение 2–3 мес.

Важно 2: Перед употреблением раствор следует профильтровать (размер пор фильтра 0,45 мкм).

Orange G6

Компоненты

1. Кристаллы Orange G (цветовой показатель 16230)	10 г
2. Дистиллированная вода	100 мл
3. Этанол 95% (v/v)	1000 мл
4. Фосфовольфрамовая кислота	0,15 г

Основной раствор номер 1 (оранжевый — orange G6, 10%-й раствор (100 г/л))

1. Растворить 10 г кристаллов Orange G в 100 мл дистиллированной воды.

262 Приложение 4 Приготовление основных растворов

2. Хорошо перемешайте. Дать отстояться перед употреблением в темно-коричневой стеклянной таре при комнатной температуре в течение одной недели.

Основной раствор номер 2 (Orange G6, 0,5%-й раствор)

1. К 50 мл основного раствора номер 1 добавить 950 мл 95% (v/v) этанола.
2. Добавить 0,15 г фосфовольфрамовой кислоты.
3. Хорошо перемешать. Хранить в темно-коричневой закрытой стеклянной таре при комнатной температуре.

Важно 1: Раствор перед использованием следует фильтровать.

Важно 2: Раствор сохраняет стабильность в течение 2–3 мес.

Гематоксилин Харриса без уксусной кислоты

Компоненты

1. Гематоксилин (темные кристаллы; цветовой показатель 75290)
2. Этанол 95% (v/v)
3. Сернокислый алюминий ($\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
4. Окись ртути (HgO)

Приготовление

1. Растворить 160 г $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в 1600 мл дистиллированной воды при нагревании.
2. Растворить 8 г кристаллов гематоксилина в 80 мл 95% (v/v) этанола.
3. Добавить раствор гематоксилина к раствору сернокислого алюминия.
4. Нагреть смесь до 95° С.
5. Сняв смесь с нагревательного прибора, и постоянно помешивая, медленно добавить окись ртути.

Важно: Раствор должен приобрести темно-пурпурный цвет.

6. Сразу же погрузить емкость с раствором в холодную баню.
7. После охлаждения раствор отфильтровать.
8. Хранить при комнатной температуре в темно-коричневом стеклянном сосуде или из алюминия.
9. Дать раствору отстояться перед использованием в течение 48 ч.
10. Требуемое количество красителя развести равной частью дистиллированной воды.
11. Еще раз отфильтровать.

Раствор Скотта водозамещающий

Важно: Раствор Скотта используют только, когда обычная водопроводная вода слишком жесткая для придания голубого цвета ядру клетки; раствор следует периодически менять, например после полоскания 20–25 предметных стекол.

Компоненты

1. Бикарбонат натрия (NaHCO_3) 3,5 г
2. Гептогидросульфат магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 20 г
3. Несколько кристаллов тимола (необходим как консервант)
4. Дистиллированная вода 1000 мл

Раствор кислого этанола

Компоненты

1. Этанол 99,5% (v/v) 300 мл
2. Концентрированная соляная кислота (HCl) 2,0 мл
3. Дистиллированная вода 100 мл

Литература

- Biggers JD et al. (1971). The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC, ed. Methods in mammalian embryology. San Francisco, WH Freeman: 86-116.
- Quinn P et al. (1985). Improved pregnancy rate in human in-vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertility and Sterility, 44:493-498.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5 Цервикальная слизь

А5.1 Введение

Сперматозоиды в цервикальной слизи находятся в жидкой среде. Взаимодействие сперматозоидов с секретом женских половых путей критически важно для выживания и сохранения функциональной способности сперматозоидов. В настоящее время отсутствуют методы, с помощью которых можно было бы оценить влияние маточной трубной жидкости на сперматозоиды. Однако цервикальная слизь легко доступна для взятия образца и исследования.

Эпителий слизистой шейки матки состоит из секреторных клеток различного типа, природа и количество секреторных клеток варьирует в различных участках шейки матки. Продукты секреции этих клеток входят в состав цервикальной слизи. Гормоны яичника регулируют секрецию цервикальной слизи: 17 β -эстрадиол стимулирует продукцию жидкой слизи, а прогестерон ингибирует секреторную активность эпителиальных клеток. Изменение объема секреции цервикальной слизи носит циклический характер. У женщин репродуктивного возраста с нормальным менструальным циклом суточная продукция слизи колеблется от 500 мкл в середине менструального цикла до менее 100 мкл в другие фазы цикла. В состав цервикальной слизи также входит небольшое количество эндометриальной, трубной и, возможно, фолликулярной жидкости.

Кроме того, в цервикальной слизи присутствуют лейкоциты и клеточный дебрис из эпителия слизистой матки и цервикального канала.

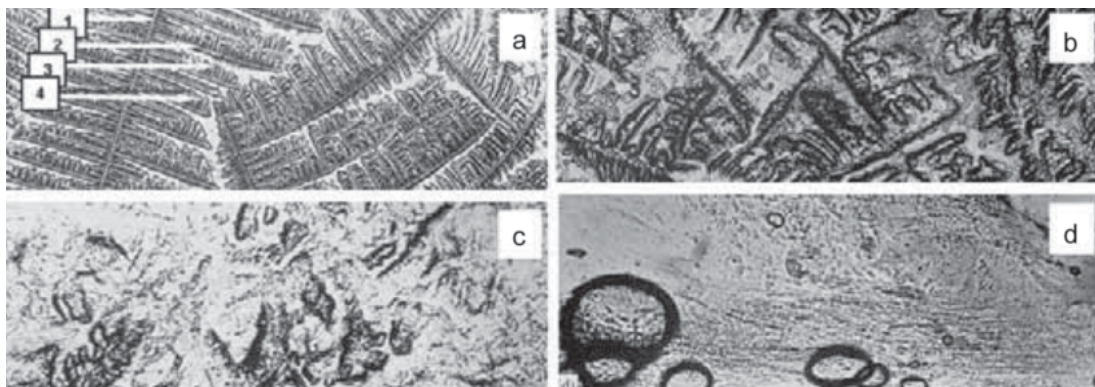
Цервикальная слизь, таким образом, представляет собой гетерогенный секрет, состоящий на 90% из воды. Она обладает рядом реологических свойств:

- Вязкость (консистенция) зависит от расположения молекул и концентрации белков и ионов цервикальной слизи. Консистенция цервикальной слизи меняется в течение цикла от очень вязкой (часто за счет клеточных элементов) в предменструальный период до водянистой, характерной для середины цикла перед овуляцией. После овуляции вязкость слизи снова повышается.
- Растяжимость — термин, употребляемый для описания волокнистости, нитевидности или эластичности цервикальной слизи.
- Кристаллизация характеризуется степенью выраженности и узором, образующимся при высыхании цервикальной слизи на поверхности предметного стекла (см. Рис. А5.1).

Цервикальная слизь представляет собой гидрогель, состоящий из компонентов высокой и низкой вязкости, к последним относят электролиты, органические соединения и растворимые белки. Компонент высокой вязкости состоит из макромолекулярной сети муцина, определяющей реологические свойства слизи. Муцин цервикальной слизи — это волокнистая система, состоящая из субъединиц, построенных из пептидного ядра и олигосахаридных боковых цепей. Циклические изменения составных (компонентов) цервикальной слизи могут влиять на проникающую способность и выживаемость сперматозоидов. Сперматозоиды способны пенетрировать цервикальную слизь приблизительно с девятого

Рис. А5.1 Примеры феномена папоротника, «рисунка», образующегося в цервикальной слизи, нанесенной на предметное стекло и высушенной на воздухе.

(а) Кристаллизация: 1, первичный стебель; 2, вторичный стебель; 3, третичный стебель; 4, четвертичный стебель (оценка 3 балла); (b) в основном первичные и вторичные стебли (оценка 2 балла), частично присутствуют третичные стебли; (c) атипичная кристаллизация (оценка 1 балл); (d) кристаллизация отсутствует (оценка 0). Округлые структуры представляют собой пузырьки воздуха. См. Раздел А5.3.3 для пояснения балльной оценки.



дня нормального 28-дневного менструального цикла; эта способность постепенно усиливается, достигая своего пика непосредственно перед овуляцией. После этого способность к пенетрации понижается, причем раньше, чем наступают видимые изменения в характере цервикальной слизи. Часто отмечают индивидуальные особенности во времени и степени проницаемости слизи для сперматозоидов. Подвижные сперматозоиды, направляемые волокнами цервикальной слизи, попадают в цервикальные крипты, где они могут собираться, а затем постепенно проникать в матку и фаллопиевы трубы.

Комментарий: Оценка взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью очень важна, и ее следует обязательно включать в обследование по поводу бесплодия. Выявление нарушений взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью может служить основанием к проведению искусственной инсеминации или других методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

А5.2 Получение и консервация образцов цервикальной слизи

А5.2.1 Процедура получения

Шейку матки обнажают в зеркалах и осторожно протирают ватным тампоном для удаления выделений из влагалища. Слизь из наружного зева извлекают при помощи тампона или пинцета. Слизь из цервикального канала получают методом аспирации при помощи туберкулинового шприца (без иглы), пипетки или полиэтиленовой трубки. При получении слизи методом аспирации важно, чтобы сила давления на поршень инструмента была стандартной. Аспирацию начинают после того, как кончик инструмента введен приблизительно на 1 см в цервикальный канал. Продолжая аспирацию, постепенно выводят инструмент. Давление на

поршень прекращают непосредственно перед выведением инструмента из наружного зева. В это момент желательно зажать катетер, чтобы предотвратить попадание пузырьков воздуха и выделений из влагалища при выведении инструмента из цервикального канала. Если это возможно, следует оценивать качество слизи сразу же после ее сбора. Если это невозможно, слизь следует законсервировать (см. Раздел А5.2.2) до проведения анализа.

Когда цервикальную слизь собирают не в середине цикла, ее продукцию можно увеличить введением женщине 20–80 мкг этинилэстрадиола в день в течение 7–10 дней до сбора. При этом методе образуется более водянистая, а следовательно менее вязкая слизь (Eggert-Kruse et al., 1989). Несмотря на то, что данный метод может быть полезен в оценке взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью *in vitro*, ее результаты не обязательно будут отражать ситуацию *in vivo* для данной пары, когда им не будут назначены гормональные препараты.

А5.2.2 Хранение и консервация

Образец цервикальной слизи можно хранить в туберкулиновых шприцах, полиэтиленовых пробирках или в небольших аналитических пробирках, плотно закрытых пробкой или лабораторной пленкой, чтобы избежать высыхания. Следует следить за тем, чтобы в контейнерах было минимальное количество воздуха. Образцы следует хранить в холодильнике при температуре 4°С не более 5 дней. Если возможно, образцы слизи следует анализировать в течение 2 дней после сбора; интервал между сбором и проведением анализа нужно всегда отмечать. В реологических исследованиях и тестах на пенетрационную способность сперматозоидов не следует использовать образцы слизи, которые были заморожены, а потом разморожены.

А5.3 Оценка цервикальной слизи

Оценка свойств цервикальной слизи включает определение ее растяжимости, кристаллизации, вязкости и pH. В приложении 6 дан образец формы для записи результатов оценки свойств цервикальной слизи согласно системе, разработанной Moghissi (1976) на основании оригинального предложения Insler с соавторами (1972). При подсчете учитывают объем собранной цервикальной слизи (см. Раздел А5.3.1) и четыре параметра (см. Разделы от А5.3.2 до А5.3.5), описывающие ее свойства и внешний вид. Данные о pH слизи не включаются в общую оценку, однако этот параметр следует измерять, так как он служит важным фактором взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью (Eggert-Kruse et al., 1993). Максимальная сумма баллов — 15. Оценка выше 10 баллов обычно говорит о хорошем качестве цервикальной слизи, благоприятствующей проницаемости сперматозоидами, а ниже 10 — о плохом качестве слизи для проникновения сперматозоидов.

А5.3.1 Объем

Вязкость цервикальной слизи затрудняет точное измерение ее объема. Его можно оценить по длине столбика слизи внутри катетера известного диаметра (см. Бокс А5.1).

Бокс А5.1 Определение объема цервикальной слизи

Объем препарата цервикальной слизи (V , мкл = мм³) получают умножением площади поперечного сечения шприца (A , мм²) на длину (L , мм) содержащейся цервикальной слизи: $V = A \times L$. Площадь поперечного сечения $A = \pi r^2$, где π равно 3,142, а r — радиус шприца. Таким образом, столбик слизи длиной 10 см (100 мм) в шприце диаметром 2 мм ($A = 3,142 \times 1 \times 1 = 3,142$ мм²) имеет объем $A \times L = 3,142 \times 100 = 314$ мм³ = 314 мкл или 0,31 мл.

Объем оценивают в баллах следующим образом.

0 = 0 мл;

1 = 0,01–0,10 мл или приблизительно 0,1 мл;

2 = 0,11–0,29 мл или приблизительно 0,2 мл;

3 = >0,3 мл или приблизительно 0,3 мл и более.

А5.3.2 Вязкость (консистенция)

Вязкость цервикальной слизи является самым важным фактором, влияющим на пенетрацию сперматозоидов. В середине менструального цикла миграция сперматозоидов сквозь цервикальную слизь осуществляется без особых препятствий, вязкая же слизь в лютеиновую фазу создает серьезный барьер.

Вязкость 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)

А5.3.3 Кристаллизация

Кристаллизацию (см. Рис. А5.1) оценивают при исследовании под микроскопом мазка цервикальной слизи, высушенного на воздухе. При этом на препарате образуются различные узоры кристаллов, которые похожи на листья папоротника. В зависимости от структуры слизи «листья папоротника» могут иметь только первичные стебли или разветвляться однократно, двукратно или трехкратно, образуя вторичные, третичные или четвертичные стебли. Просматривают несколько полей зрения, сумму баллов подсчитывают с учетом наивысшей степени образования листьев папоротника, типичного для данного образца слизи.

Тип стеблей папоротника может быть различным в зависимости, например, от толщины препарата и количества присутствующих клеточных элементов. На препарате можно увидеть более одной степени кристаллизации: иногда все стадии присутствуют на одном образце.

Кристаллизацию оценивают следующим образом:

0 = кристаллизация отсутствует;

1 = формирование атипичных стеблей папоротника;

- 2=первичные и вторичные стебли папоротника;
- 3=третичные и четвертичные стебли папоротника.

А5.3.4 Растяжимость

Поместите каплю цервикальной слизи на предметное стекло и накройте покровным стеклом или другим предметным стеклом крест-накрест, затем осторожно его приподнимите. Оцените длину нити цервикальной слизи, образующейся между стеклами.

Растяжимость оценивают следующим образом:

- 0 = < 1 см;
- 1 = 1–4 см;
- 2 = 5–8 см;
- 3 = 9 см и более.

А5.3.5 Клеточный состав

Рекомендуется выражать результаты подсчета в «клетках на мкл». Оценка содержания лейкоцитов и других клеток в цервикальной слизи традиционно основана на числе клеток, подсчитанных в поле зрения при микрокопировании с высоким разрешением (МВР) (см. Бокс А5.2).

Бокс А5.2 Наблюдаемый объем при микрокопировании с высоким разрешением на препарате глубиной 100 мкм

Объем цервикальной слизи, наблюдаемой в каждом поле зрения, зависит от величины поля зрения (πr^2 , где $\pi = 3,142$, а r — радиус поля зрения микроскопа) и глубины камеры (здесь 100 мкм). Диаметр поля зрения микроскопа может быть измерен с помощью стандартного микрометра или оценен делением диаметра апертуры окуляра на увеличение объектива.

При увеличении объектива $\times 40$ и окуляра $\times 10$ (апертура 20 мм) поле зрения микроскопа имеет диаметр, приблизительно равный 500 мкм (20 мм/40). В этом случае $r = 250$ мкм, $r^2 = 62\,500$ мкм², $\pi r^2 = 196\,375$ мкм², а объем равен 19 637 500 мкм³ или около 20 нл.

Таким образом, 10 клеток при МВР будет соответствовать 10 клеткам в объеме 20 нл или 500 клеткам на мкл. Так как подсчитанное число клеток мало, ошибка выборки высока; повторный подсчет 10 клеток при МВР имеет ошибку выборки 22% (см. Табл.2.2), поэтому значение может лежать в диапазоне между 280 и 720 клеток на мкл.

Оценка клеток в баллах следующая:

- 0 = >20 клеток на поле зрения при МВР или >1000 клеток на мкл;
- 1 = 11–20 клеток на поле зрения при МВР или 501–1000 клеток на мкл;
- 2 = 1–10 клеток на поле зрения при МВР или 1–500 клеток на мкл;
- 3 = 0 клеток.

А5.3.6 pH

pH цервикальной слизи определяют с помощью индикаторной бумаги (пределы значений 6,4–10,0) *in situ* или сразу после взятия образца. Если pH измеряют *in situ*, следует избегать прикосновений экзоцервикальной слизи, которая всегда имеет более низкое значение pH (более кислая), по сравнению со слизью в эндоцервикальном канале. Следует также избегать смешивания с выделениями из влагалища, имеющими кислотное значение pH.

Сперматозоиды чувствительны к изменению pH цервикальной слизи. Кислая слизь иммобилизует сперматозоиды, в то время как щелочная может усиливать их подвижность. Однако избыточное защелачивание цервикальной слизи (pH больше 8,5) может оказывать отрицательное влияние на жизнеспособность сперматозоидов. Оптимальные значения pH для движения сперматозоидов находятся в пределах 7–8,5, что соответствует уровню pH нормальной цервикальной слизи в середине менструального цикла. Хотя при pH между 6,0 и 7,0 пенетрация возможна, подвижность спермиев часто нарушена при pH ниже 6,5, а тест на взаимодействие сперматозоидов с цервикальной слизью часто невыполним, если pH ниже 7,0.

В некоторых случаях цервикальная жидкость может быть существенно более кислая. Это может быть следствием либо патологической секреции, либо наличия бактериальной инфекции, а также контаминации жидкостью из влагалища.

Литература

- Eggert-Kruse W et al. (1989). Prognostic value of in-vitro sperm penetration into hormonally standardized human cervical mucus. *Fertility and Sterility*, 51:317–323.
- Eggert-Kruse W et al. (1993). The pH as an important determinant of sperm–mucus interaction. *Fertility and Sterility*, 59:617–628.
- Insler V et al. (1972). The cervical score. A simple semiquantitative method for monitoring of the menstrual cycle. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 10:223–228.
- Moghissi KS (1976) Postcoital test: physiological basis, technique and interpretation. *Fertility and Sterility*, 27:117–129.

ПРИЛОЖЕНИЕ 6 Формы для записи результатов анализа эякулята и цервикальной слизи

А6.1 Образец формы для записи результатов семиологического анализа

Образец формы для записи результатов на следующей странице предлагается как модель. Он позволяет записывать наблюдения, сделанные во время семиологического анализа с использованием методов, описанных в данном руководстве. Форма может быть адаптирована, в нее можно включить переменные, которые являются производными первичных данных (например, общее число пероксидаза-положительных клеток во всем эякуляте). Для исследовательских целей данные из приведенного образца формы для записи могут быть введены напрямую в базу данных компьютера, а любые производные переменные рассчитаны автоматически. Образец формы для записи результатов имеет несколько колонок для отображения результатов семиологических анализов, выполненных в разное время. Это удобно для представления последовательных данных семиологического анализа. Может быть полезно добавить дополнительное пространство в некоторые части формы для того, чтобы записывать дополнительные комментарии и наблюдения. Минимальные референсные значения и консенсусные пограничные значения (см. Приложение 1, Табл. 1.1 и комментарии), где они определены, указаны в квадратных скобках.

ФИО:			
Код:			
Дата (день/месяц/год)			
Место сбора образца (1, лаборатория; 2, дом)			
Время сбора образца (час: мин)			
Время доставки образца (час: мин)			
Время выполнения анализа (час: мин)			
Пациент			
Количество дней полового воздержания			
Прием медикаментозных препаратов			
Трудности при сборе эякулята			
Эякулят			
Обработка (например, бромелайн)			
Весь эякулят? (1, собран полностью; 2, потеря)			
Внешний вид (1, норма; 2, аномалия)			
Вязкость (1, норма; 2, аномалия)			
Разжижение (1, норма; 2, аномалия) (мин)			
Агглютинация (1–4, А–Е)			
pH [≥ 7.2]			
Объем (мл) [≥ 1.5]			
Сперматозоиды			
Общее количество (10^6 /эякулят) [≥ 39]			
Концентрация (10^6 /мл) [≥ 15]			
Ошибка (%), если подсчитано менее 400 клеток			
Жизнеспособность (% живых) [≥ 58]			
Общая подвижность PR + NP (%) [≥ 40]			
Прогрессивно подвижные PR (%) [≥ 32]			
Непрогрессивно подвижные NP (%)			
Неподвижные IM (%)			
Морфологически нормальные формы (%) [≥ 4]			
Аномалия головки (%)			
Аномалия шейки (%)			
Аномалия жгутика (%)			
Сперматозоиды с цитоплазматической каплей (%)			
Прямой MAR-тест IgG (%) (3 или 10 мин) [< 50]			
Прямой MAR-тест IgA (%) (3 или 10 мин) [< 50]			
Прямой IB-тест IgG (% клеток, склеенных с шариками) [< 50]			
Прямой IB-тест IgA (% % клеток, склеенных с шариками) [< 50]			
Клетки, отличные от сперматозоидов			
Пероксидаза-положительные клетки, концентрация (10^6 /мл) [< 1.0]			
Функция желез дополнительной секреции			
Цинк (мкмоль/эякулят) [≥ 2.4]			
Фруктоза (мкмоль/эякулят) [≥ 13]			
α -Глюкозидаза (нейтральная) мЕд/эякулят) [≥ 20]			
Анализ выполнил:			

А6.2 Образец формы для записи свойств цервикальной слизи

ФИО:
Код:
Дата первого дня последней менструации (день/месяц/год):

Оценка цервикальной слизи				
Дата (день/месяц/год)				
День цикла				
Объем (0, 1, 2, 3)				
Вязкость (0, 1, 2, 3)				
Феномен папоротника (0, 1, 2, 3)				
Растяжимость (0, 1, 2, 3)				
Состав клеток (0, 1, 2, 3)				
Суммарная оценка (max. 15)				
pH				

Посткоитальный тест						
Дата (день/месяц/год)						
Время после коитуса (ч)						
	Ваги- нальная часть	Эндо- церви- кальная часть	Ваги- нальная часть	Эндо- церви- кальная часть	Ваги- нальная часть	Эндо- церви- кальная часть
Концентрация сперматозоидов (в мкл)						
Подвижность сперматозоидов						
PR (%)						
NP (%)						
IM (%)						
Анализ выполнил:						

ПРИЛОЖЕНИЕ 7 Ошибки расчета и контроль качества

А7.1 Ошибки при расчете концентрации сперматозоидов

А7.1.1 Ошибки подсчета при оценке концентрации сперматозоидов

При оценке концентрации сперматозоидов их число подсчитывают в фиксированном объеме разведенного эякулята в расчетной камере. Однако единичный подсчет дает ограниченное значение без указания точности расчета. Точность значения определяется доверительным интервалом, в котором с определенной вероятностью (доверительный коэффициент или вероятность покрытия) находится истинное значение. Наиболее часто используемая вероятность — 0,95. Интервал поэтому называется 95% доверительным интервалом, концы этого интервала — 95% доверительные границы (Armitage et al., 2002). Если сперматозоиды случайным образом распределены в камере, их количество в данном объеме соответствует распределению Пуассона, где дисперсия равна подсчитанному числу. Средняя квадратичная ошибка (standard error, SE) числа N равна \sqrt{N} , ошибка, выраженная в процентах, (%SE) — $100 \times (\sqrt{N}/N)$, а 95% доверительный интервал (confidence interval, CI) приблизительно равен $N \pm 1,96 \times SE$ (или $N \pm \sim 2 \times SE$).

Важно: Эти значения являются только приблизительными, так как доверительные границы не всегда симметричны относительно оцениваемого значения. Точный 95% доверительный интервал, основанный на распределении Пуассона, равен 361,76–441,21 при подсчете 400, 81,36–121,66 при подсчете 100, 4,80–18,39 при подсчете 10, 0,025–5,572 при подсчете 1 и 0,0–3,7 при подсчете 0.

А7.1.2 Корреляция между двумя повторными подсчетами

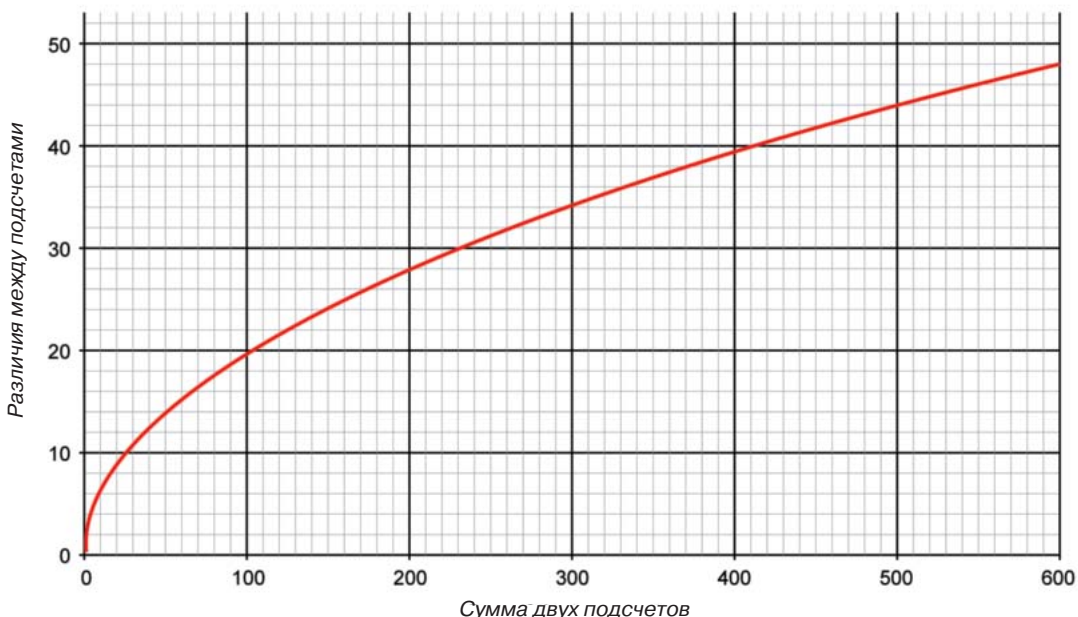
Рекомендуется повторный подсчет двух независимых разведений каждого образца эякулята для оценки возможного отклонения распределения сперматозоидов, несмотря на тщательное перемешивание (см. Раздел 2.4.1). Оценка одной и той же камеры дважды или оценка обеих сторон камеры, заполненной одним разведением, не есть истинный повторный подсчет, так как он не позволяет выявить ошибки приготовления препарата, смешивания и разведения.

Различия между независимыми подсчетами, как ожидается, равны нулю, при этом стандартная ошибка равна квадратному корню из суммы двух значений. То есть $z = (N1 - N2)/\sqrt{(N1 + N2)}$ может быть $< 1,96$ за счет только случайности; если это так, значения приемлемы. Если $z > 1,96$, делают новое разведение. Рис. А7.1 показывает округленные приемлемые значения для $N1-N2$.

Например, при расчете 200 сперматозоидов (сумма 400) разница между повторными расчетами не должна превышать 39, то есть два подсчета могли бы быть 180,5 (200 – 19,5) и 219,5 (200 + 19,5) за счет только случайности. Табл. А7.1 суммирует данные, приведенные на Рис. А7.1 и может быть использована для оценки корреляции между двумя повторными расчетами (см. Раздел 2.8.3 и 2.11).

Рис. А7.1 Приемлемые различия между двумя повторными подсчетами как функция общего числа оцененных сперматозоидов

Линия показывает максимальное различие между двумя подсчетами, которое, как ожидается, характерно только при случайных событиях.



Для рутинного анализа сперматозоидов рекомендовано, чтобы не менее 200 сперматозоидов было подсчитано на каждый повтор, так чтобы суммарно около 400 клеток было оценено; ошибка расчета тогда составит менее 5% (см. Табл. 2.2). При очень низком количестве сперматозоидов может неизбежно возникать более высокая ошибка подсчета (см. Раздел 2.11.1 и 2.11.2), при котором следует в отчете указывать ошибку расчета при данном числе подсчитанных сперматозоидов (см. Табл. 2.2).

Таблица А7.1 Приемлемые различия между двумя повторными подсчетами, исходя из полученной суммы значений

Сумма	Различие*	Сумма	Различие*	Сумма	Различие*
35–40	12	144–156	24	329–346	36
41–47	13	157–169	25	347–366	37
48–54	14	170–182	26	367–385	38
55–62	15	183–196	27	386–406	39
63–70	16	197–211	28	407–426	40
71–79	17	212–226	29	427–448	41
80–89	18	227–242	30	449–470	42
90–98	19	243–258	31	471–492	43
99–109	20	259–274	32	493–515	44
110–120	21	275–292	33	516–538	45
121–131	22	293–309	34	539–562	46
132–143	23	310–328	35	563–587	47

*На основании округленного 95% доверительного интервала.

А7.2 Важность понимания ошибок подсчета

Данное руководство делает акцент на подсчете достаточного числа сперматозоидов и выполнении повторной оценки для соответствия определенным предельным значениям. Это необходимо, так как такие процедуры увеличивают достоверность того, что рассчитанная концентрация или общее количество находятся близко к истинному (но неизвестному) значению. Если слишком мало сперматозоидов подсчитано, рассчитанная концентрация будет неточная. Если невозможно подсчитать около 400 сперматозоидов, это следует указать в отчете и написать ошибку расчета (см. Табл. 2.2).

Точность наилучшим образом достигается путем подсчета в глубоких камерах с большой областью расчетных квадратов, которые содержат большое число сперматозоидов, по сравнению с мелкими камерами с небольшим числом клеток. Для облегчения подсчета сперму следует тщательным образом разводить в фиксаторе так, чтобы присутствовало лишь небольшое наложение неподвижных клеток. Пример ниже показывает разницу между камерами по точности оценки образца спермы с низкой концентрацией сперматозоидов.

Для камеры с небольшим объемом с сеткой размером 1×1 мм, заполненной неразведенным эякулятом:

- Если истинная концентрация сперматозоидов — 1×10^6 на мл, присутствует 1000 сперматозоидов в мкл, или 1 сперматозоид в нл.
- В камере глубиной 10 мкм с сеткой 1×1 мм будет присутствовать 10 сперматозоидов во всем квадрате 10 нл.
- Ошибка, связанная с подсчетом только 10 сперматозоидов, равна 32%, а 95% доверительный интервал — $10 \pm 1,96\sqrt{N}$ ($= 10 \pm 6,2$) (см. Табл. 2.2).
- Такой большой доверительный интервал означает, что истинное количество может находиться между 4 сперматозоидами ($10 - 6$) и 16 ($10 + 6$) во всем объеме 10 нл.
- Таким образом, оцениваемая концентрация находится между 400 000 и 1 600 000 сперматозоидами в мл эякулята.
- На практике это означает, что наилучшая оценка объема 50 мкл между 20 000 и 80 000 сперматозоидами.
- Если повторно оценен препарат, значения для наблюдаемых 20 сперматозоидов могут иметь ошибку 22%, доверительный интервал $20 \pm 8,8$, или значения от 11 ($20 - 9$) и 29 ($20 + 9$) во всем объеме 20 нл, оценка истинного значения находится в диапазоне между 550 000 сперматозоидов в мл до 1 450 000 в мл и между 27 500 и 72 500 сперматозоидов в аликвоте 50 мкл.

Для камеры с большим объемом с 9 квадратами размером 1×1 мм, заполненной разведенным эякулятом в соотношении 1 + 1 (1:2):

- Если истинная концентрация сперматозоидов равна 1×10^6 в мл, и выполнено разведение 1 + 1 (1:2) (см. Раздел 2.8), будет присутствовать 500 000 сперматозоидов в мл, 500 сперматозоидов в мкл или 0,5 сперматозоида в нл.

- В камере глубиной 100 мкм с несколькими квадратами 1×1 мм (100 нл на квадрат) будет содержаться 200 сперматозоидов в четырех квадратах (400 нл), 400 в двух повторных измерениях (800 нл).
- Ошибка, связанная с расчетом 400 сперматозоидов, равна 5% и 95% доверительный интервал — $400 \pm 1,96 \times \sqrt{N}$ ($= 400 \pm 39$) (см. Табл. 2.2).
- Такой доверительный интервал означает, что истинное значение может находиться между 360 сперматозоидами ($400 - 40$) и 440 ($400 + 40$) в суммарном объеме 800 нл при разведении $1 + 1$ (1:2).
- Таким образом, оценка концентрации находится между 900 000 и 1 100 000 сперматозоидов в мл неразведенного эякулята.
- На практике это означает, что 50 мкл спермы содержит число сперматозоидов между 45 000 и 55 000.

А7.3 Ошибки при измерении процентных значений

А7.3.1 Ошибки при оценке процентных значений

Когда сперматозоиды распределяют на два класса (например, нормальные и аномальные, подвижные и неподвижные, живые и мертвые, с прореагировавшей акросомой и нет, связанные с зоной пеллюцида ооцитов хомячка и нет), процентные значения подчиняются биномиальному распределению. Для такого распределения стандартная ошибка оцениваемого процентного значения (p) внутри класса зависит от истинного, но неизвестного процентного значения, а также от числа подсчитанных сперматозоидов (N). Стандартная ошибка равна $\sqrt{p(100 - p)/N}$, приблизительный доверительный интервал можно вывести из нормального распределения. Это хорошая аппроксимация для значений в диапазоне 20–80%.

- Если подсчитано 100 сперматозоидов, процент морфологически нормальных равен 20%, стандартная ошибка оцениваемого процента нормальных сперматозоидов равна $\sqrt{(20(100 - 20)/100)} = \sqrt{(20 \times 80)/100} = \sqrt{(1600/100)} = 4\%$. 95% доверительный предел равен $\pm 1,96 \times 4\%$ или $\pm 7,8\%$, соответствующий доверительный интервал — 12,2–27,8%.
- Если подсчитано 200 сперматозоидов, стандартная ошибка равна $\sqrt{(20(100 - 20)/200)} = \sqrt{(20 \times 80)/200} = \sqrt{(1600/200)} = 2,8\%$. 95% доверительный предел $\pm 1,96 \times 2,8\%$ или $\pm 5,5\%$, соответствующий доверительный интервал — 14,5–25,5%.
- Если подсчитано 400 сперматозоидов, стандартная ошибка равна $\sqrt{(20(100 - 20)/400)} = \sqrt{(20 \times 80)/400} = \sqrt{(1600/400)} = 2,0\%$. 95% доверительные границы $\pm 1,96 \times 2\%$ или $\pm 3,9\%$ и соответствующий доверительный интервал — 16,1–23,9%.

Вне диапазона 20–80% более подходяще использовать угловое преобразование (\arcsin квадратного корня) $z = \sin^{-1} \sqrt{p/100}$. При таком преобразовании стандартное отклонение z равно $1/(2\sqrt{N})$ и поэтому оно зависит только от числа подсчитанных сперматозоидов и не зависит от истинного (но неизвестного) процентного значения. Альтернативно можно вычислить точные биномиальные доверительные

пределы, используя один из нескольких широко доступных статистических пакетов.

A7.3.2 Корреляция между повторными расчетами процентов

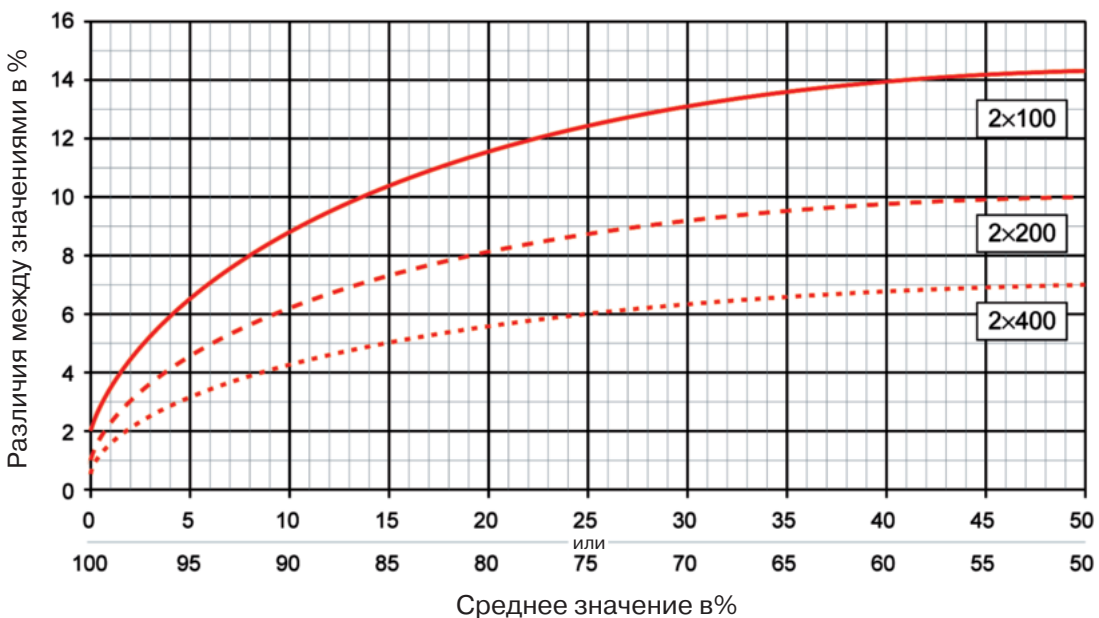
Рекомендуется выполнять повторную оценку процентных значений (p_1 и p_2) на N сперматозоидах в каждом образце и сравнивать полученные значения. Ожидаемый предел различия d (где $d = |p_1 - p_2|$) равен $1,96(\sqrt{(2\bar{p}(100 - \bar{p})/N)})$, где $\bar{p} = (p_1 + p_2)/2$. Разница между независимыми оценками, как ожидается, должна быть равна нулю при стандартной ошибке, зависимой от оцениваемого процента и общего числа подсчитанных сперматозоидов.

Большие статистические ошибки, связанные с подсчетом менее 200 сперматозоидов на повтор, показаны на Рис. A7.2, на котором указаны точные 95% доверительные интервалы для процентных значений при повторных расчетах 100, 200 и 400 сперматозоидов (то есть суммарно 200, 400 и 800 сперматозоидов). На рисунке также показано, что ошибка симметрична вокруг 50% с максимумом в 50% и минимумом в точках 0% и 100%.

Приемлемые различия между двумя повторными расчетами можно оценить из этого графика. Для 200 сперматозоидов (100 на повтор) и истинного процента 5% (или 95%) верхний 95% доверительный предел для разницы равен 6,6%. В среднем, 19 из 20 повторных вычислений одного и того же образца будут между 2,42% и 9%; один из 20 даст результат вне данных пределов. Для 800 сперматозоидов (400 на повтор: прерывистая линия) и истинном проценте 5% (или 95%), верхний 95% довери-

Рис. A7.2 Приемлемые различия между двумя повторными оценками как функция истинного процента и общего числа оцененных сперматозоидов.

Линии показывают ожидаемые только за счет случайности различия (95% доверительные границы) для повторно оцененных процентных значений при 100 (суммарно 200: верх, сплошная линия), 200 (суммарно 400: середина, прерывистая линия) и 400 (суммарно 800: низ, пунктирная линия) сперматозоидах.



278 Приложение 7 Ошибки расчета и контроль качества

тельный предел для разницы равен 3,1%, а 95% доверительные пределы — 3,1% и 7,6%. Аналогично, если суммарно подсчитано 400 сперматозоидов (200 на повтор; пунктирная линия) для истинного значения 20% (или 80%) верхний доверительный предел равен 8,1% с границами 16,2% и 24,3%.

В Табл. А7.2, А7.3 и А7.4 представлены данные о приемлемых различиях между повторами (возникают только в силу случайности) для диапазона процентных значений, оцениваемых при различном суммарном количестве оцененных сперматозоидов. Эти данные могут быть более полезны, чем график (Рис. А7.2) для оценки корреляции между повторными процентами сперматозоидов, которые морфологически нормальны, подвижны, живые или с прореагировавшей акросомой.

Таблица А7.2 Приемлемые различия между двумя процентными значениями, исходя из полученного среднего при повторных расчетах 100 сперматозоидов (суммарно 200 подсчитанных сперматозоидов)

Среднее (%)	Различие*	Среднее (%)	Различие*
0	2	67–74	13
1	3	75–80	12
2	4	81–84	11
3	5	85–87	10
4	6	88–90	9
5–6	7	91–93	8
7–9	8	94–95	7
10–12	9	96	6
13–15	10	97	5
16–19	11	98	4
20–25	12	99	3
26–33	13	100	2
34–66	14		

*На основании округленного 95% доверительного интервала.

Таблица А7.3 Приемлемые различия между двумя процентными значениями, исходя из полученного среднего при повторных расчетах 200 сперматозоидов (суммарно 400 сперматозоидов)

Среднее (%)	Различие*	Среднее (%)	Различие*
0	1	66–76	9
1	2	77–83	8
2	3	84–88	7
3–4	4	89–92	6
5–7	5	93–95	5
8–11	6	96–97	4
12–16	7	98	3
17–23	8	99	2
24–34	9	100	1
35–65	10		

*На основании округленного 95% доверительного интервала.

Таблица А7.4 Приемлемые различия между двумя процентными значениями, исходя из полученного среднего при повторных расчетах 400 сперматозоидов (суммарно 800 сперматозоидов)

Среднее (%)	Различие*	Среднее (%)	Различие*
0	0	70–81	6
1–3	2	82–88	5
4–6	3	89–93	4
7–11	4	94–96	3
12–18	5	97–99	2
19–30	6	100	0
31–69	7		

* На основании округленного 95% доверительного интервала.

А7.4 Приготовление образцов эякулята для контроля качества

Образцы для контроля качества должны быть идеально репрезентативными в диапазоне образцов эякулята, обрабатываемых в лаборатории. Если только небольшое количество образцов для КК необходимо проанализировать, они должны отражать основную деятельность лаборатории. Например, в лаборатории по диагностике бесплодия клинически значимый диапазон (концентрация от 15×10^6 до 50×10^6 на мл, прогрессивная подвижность 30–50% и морфологически нормальные сперматозоиды ниже 5%) может быть выбран следующим образом.

- Аликвоты образцов спермы с низкими показателями можно хранить замороженными или при температуре 4°C в криопротекторе и анализировать их концентрацию.
- Сперматозоиды могут не выжить при криоконсервации достаточно хорошо, чтобы их можно было использовать как материал для внутреннего и внешнего КК при расчете подвижности и для теста на антиспермальные антитела.
- Также для расчета подвижности сперматозоидов можно использовать видеокассеты, CD и DVD.
- Фотографии, видеокассеты, CD и DVD можно использовать для анализа морфологии сперматозоидов.
- Видеозаписи особенно полезны для тренировок оценки подвижности и морфологии, но их использование должно быть лишь как дополнительная мера, а не как замена истинной оценки и повторной оценки образца эякулята.
- Окрашенные мазки спермы на предметных стеклах могут быть использованы для контроля качества при оценке морфологии. Фиксированные мазки также можно хранить и использовать для контроля процедуры окрашивания. Окрашенные препараты могут со временем повреждаться в зависимости от качества фиксации или процедуры окрашивания. Однако предметные стекла, окрашенные по Папаниколу, как описано в данном руководстве, и хранимые в темноте при ком-

натной температуре, могут сохраняться в течение нескольких месяцев и даже лет.

- Сыворотка с наличием антиспермальных антител может быть использована для КК в непрямом тесте с иммунными шариками, но не рекомендуется ее использовать в прямом тесте с иммунными шариками.

A7.5 Создание видеозаписи для контроля качества при анализе подвижности сперматозоидов

В данном протоколе приведено описание, как приготовить видеозапись, которую можно использовать для контроля качества ручной процедуры оценки подвижности.

- Запишите не менее 5 и не более 10 полей зрения, чтобы имитировать множественные поля зрения, оцениваемые при расчете подвижности во время анализа спермы и чтобы не менее 400 сперматозоидов были оценены.
- Видеозапись должна содержать изображение нескольких различных образцов спермы с подвижностью, которая наиболее типична во время рутинной оценки.
- Видеозапись может просто иметь пять полей зрения нескольких различных образцов спермы; в других случаях может понадобиться более сложная запись, например, для стандартизации между лабораториями или в мультицентровом исследовании. В таком случае можно использовать больше образцов спермы и их можно случайным образом повторять на протяжении видеозаписи. Повторение образцов позволит оценить точность конкретного исследователя.

A7.5.1 Дополнительное оборудование

Кроме обычного оборудования для оценки подвижности изготовление записи для контроля качества потребует:

- видеокамера или компьютер с CD-RW или DVD-RW приводами;
- маркирующий прибор для кодировки видеосигнала, такой как предметное стекло с нанесенными цифрами на поверхности (английский видеоискатель) или секундомер.

A7.5.2 Процедура

- Если доступно несколько образцов спермы, можно создать всю видеозапись за один раз; в противном случае образцы спермы записывают по мере доступности.
- Если подвижность оценивают при комнатной температуре, видеозаписи также следует делать при комнатной температуре. Аналогично, если подвижность в обычном режиме оценивают при температуре 37°С, видеозапись следует делать при той же температуре.

Важно: Если необходимо сделать видеозапись при температуре 37°С, следует включить нагревательный столик не менее чем за 10 мин до начала работы для установления стабильной температуры поверхности.

- Приготовьтесь записывать достаточное число полей зрения, чтобы убедиться, что 400 сперматозоидов будут присутствовать в каждом анализируемом образце спермы.
- При низкой концентрации сперматозоидов может быть необходимо записать более 10 полей зрения, чтобы получить достаточное число сперматозоидов для оценки. Видеозапись 10 полей зрения будет занимать несколько минут.
- Видеозапись может быть сделана, когда для анализа используют предметное стекло вместе с покровным или счетную камеру глубиной 20 мкм.

Важно 1: При использовании одноразовой счетной камеры подвижность будет стабильна более длительный период, чем при использовании предметного стекла вместе с покровным. Это позволит записать 10 (и более) полей зрения на одном и том же препарате.

Важно 2: При использовании препарата на предметном стекле вместе с покровным их может понадобиться несколько, чтобы избежать заметного снижения подвижности во время съемки.

- Установите несколько образцов спермы с подвижностью в рамках установленного диапазона.
- Каждый образец должен иметь уникальный код видеозаписи. Кодирование можно менять от простой подписи каждого образца до маркировки каждого поля зрения каждого образца. Например, маркер первого образца может начинаться в первом поле зрения и никакой другой код не появляется до момента появления второго образца. Альтернативно, кодировка может включать маркеры каждого отдельного поля зрения, то есть первое поле первого образца следует маркировать 01–01, второе поле первого образца — 01–02 и т. д. Такая более продуманная система маркировки помогает лаборантам отслеживать место оценки во время анализа.

Важно 1: Во время видеозаписи полезно иметь разделитель для полей зрения и образцов. Это позволяет лаборанту различать начало каждого нового сегмента.

Важно 2: Наиболее простой способ получить разделитель — использовать лист и прикрывать им источник света.

Важно 3: Это также можно сделать с помощью паузы при записи видеофрагмента; следует всегда использовать кнопку «пауза», а не «стоп», так как «стоп» может вызывать помехи или статические шумы на видеокассете.

- Запишите изображение микрометра предметного столика в течение 10 сек при увеличении, которое будет использовано при записи образ-

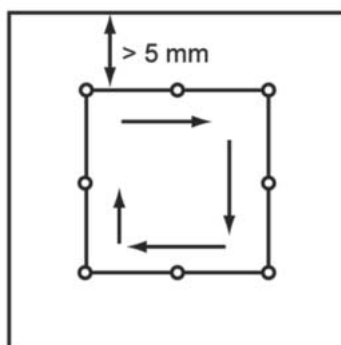
цов. Увеличение должно обеспечить изображение, сходное с тем, которое используют при микроскопическом анализе. Изображение микрометра предметного столика дает постоянную запись увеличения, которое позволяет откалибровать наложенную сетку во время анализа видеофрагмента или инструмент CASA.

- Запишите код изображения первого образца в течение 5–7 сек. В конце этого времени закройте источник света на 3 сек для получения белой картинку как маркера, затем паузу запишите.
- Определите первый образец спермы для процедуры записи. Поместите 10 мкл хорошо перемешанной спермы на предметное стекло и накройте покровным размером 22 × 22 мм либо поместите камеру с 7 мкл хорошо перемешанной спермы. Позвольте образцу стабилизироваться в течение нескольких секунд (при температуре 37° С, если нужно) до момента остановки движения жидкости. Запишите 10 (или более) полей зрения, двигаясь по препарату, как показано на Рис. А7.3. Для КК систем CASA концентрация сперматозоидов в образце не должна превышать 50×10^6 в мл; более концентрированные образцы должны быть разбавлены (см. Раздел 3.5.2).
- Выберите первое поле зрения близко к левому краю покровного стекла или камеры, не дальше 5 мм от края. Записывайте поле зрения в течение 15 сек, удерживая микроскоп неподвижным. После 15 сек запишите 3 сек пустого белого поля и приостановите запись. Если отдельные поля зрения кодируются, измените код и запишите картинку с кодом в течение 5–7 сек.
- Перемещайтесь согласно Рис. А7.3, разместите второе поле зрения и записывайте его в течение 15 сек. Снова запишите 3 сек пустого чистого поля в конце 15 сек. Приостановите запись и, если желаете, измените номер кода для обозначения третьего поля. Продолжайте запись в такой манере до тех пор, пока не достигните не менее 400 сперматозоидов (10 полей зрения или больше, в зависимости от концентрации). После записи последнего поля зрения и 3-секундного пустого поля остановите запись.
- Приготовьте второй образец. Запишите кодирующее изображение образца в течение 5–7 сек с последующим пустым изображением длиной 3 сек.
- Запишите второй образец согласно пунктам (этапам), описанным выше, записывая 10 и более полей зрения в течение 15 сек каждое с белыми пустыми изображениями между каждым полем зрения и в конце последнего поля зрения.
- Повторяйте процесс до тех пор, пока нужное количество образцов не будет записано.

Важно: Если желаете получить более сложную запись для внутреннего КК, содержащую повторные образцы, необходимо второе записывающее устройство или компьютер, оборудованный специальным программным обеспечением для обработки видео. В таком случае каждый образец следует записывать отдельно только с маркирующим полем. Порядковый номер образца не следует записывать, так как он

Рис. А7.3 Техника движения (перемещения) при оценке подвижности сперматозоидов

Методичное изучение полей зрения, находящихся не менее 5 мм от концов покровного стекла, для создания записи при оценке подвижности сперматозоидов.

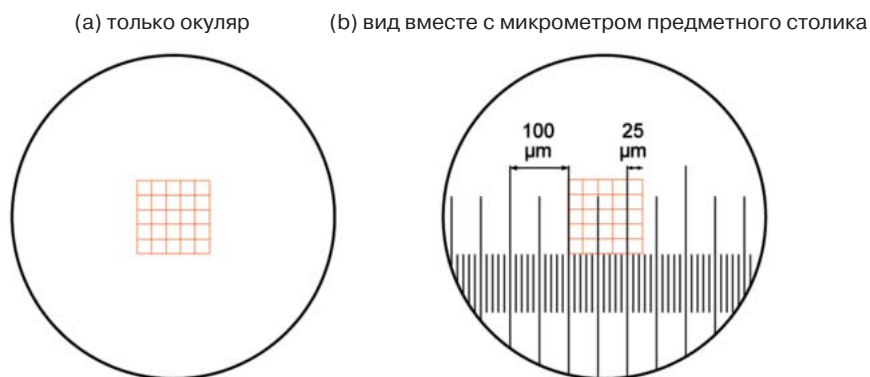


будет меняться из-за повторения образцов спермы при записывании. Если доступен компьютер, оборудованный программным обеспечением для обработки видео, изображения каждого образца должны быть оцифрованы и объединены на DVD.

А7.5.3 Анализ видеозаписи

- Нарисуйте ацетатную сетку и поместите ее на видеомонитор для использования во время оценки изображения, как описано выше. Она будет имитировать сетку на окуляре, которую используют во время микроскопического анализа (см. Рис. А7.4а).

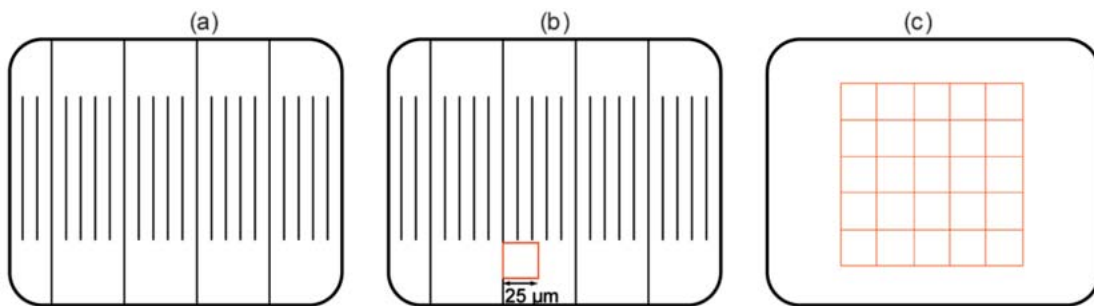
Рис. А7.4 Вид через окуляр с сеткой (красный квадрат)



- Поместите микрометр предметного столика под микроскоп с увеличением, используемым для анализа подвижности. Смотря через окуляр с сеткой (см. Рис. А7.4), измерьте размер делений квадратов с использованием микрометра предметного столика. В образце на рисунке сетка имеет размер 125×125 мкм, а каждый квадрат равен 25×25 мкм (Рис. А7.4б). Запишите результаты данных измерений.
- Запустите видео на мониторе и остановите на изображении микрометра (Рис. А.7.5а).

- Установите ацетатный лист на экране и нарисуйте квадрат размером с один квадрат сетки на окуляре, как измерено выше (см. Рис. А7.5b).
- Дополните полученное изображение мелкими квадратами (25 квадратов) (Рис. А.7.5c).
- Для анализа видефрагмента закрепите ацетатную сетку на мониторе. Анализ следует выполнять на стандартизированных квадратах, то есть в верхних двух рядах или в трех средних рядах.
- Оцените двукратно 200 сперматозоидов на каждом записанном сегменте.

Рис. А7.5 Вид микрометра предметного столика на мониторе и нарисованная сетка (а–с), см. текст для объяснения



A7.6 Приготовление разбавленного эякулята для контроля качества при определении концентрации сперматозоидов

A7.6.1 Общие положения

- Некоторые пункты (этапы) процедуры определения концентрации сперматозоидов в эякуляте можно выполнять с использованием разведенного сохраненного образца, приготовленного в лаборатории.
- Образцы для внутреннего КК должны быть репрезентативными в диапазоне концентраций, обычно наблюдаемых в лаборатории при рутинном семиологическом анализе.
- Разбавьте сперму консервантом и поместите аликвоты в виалы для хранения. Их можно заморозить и позднее использовать для подсчета.
- Проявляйте аккуратность при приготовлении суспензии хорошо перемешанного эякулята, чтобы гарантировать, что виалы с одним и тем же образцом имеют одинаковую концентрацию сперматозоидов. Только в таком случае разница при анализе образцов для внутреннего КК может быть связана с проблемами процедуры подсчета.
- Разведите хранящиеся образцы спермы для внутреннего КК снова до проведения оценки концентрации с использованием гемоцитометра. Используйте конечную концентрацию аналогичную таковой при рутинном семиологическом анализе. Убедитесь, что концентрация клеточного дебриса и клеток, отличных от сперматозоидов, будет также сходной с таковой при рутинной оценке. Например, если сперма первоначально разведена в равном объеме консерванта, дополнительное разведение 1 + 9 (1:10) даст конечную концентрацию 1:20.

- Когда необходимо оценить образцы с низкой концентрацией, лучше начать с них, а не с образцов, требующих большего разведения. Убедитесь, что концентрации дебриса и округлых клеток сходны с таковой при рутинном подсчете.
- Препараты, обработанные методом swim-up, без клеточного дебриса, обломков клеток и контаминации лучше использовать для контроля таких же обработанных суспензий сперматозоидов.
- Число суспензий со сперматозоидами для внутреннего КК за раз зависит от числа лаборантов и частоты подсчета.
- Разведенные образцы спермы с консервантом в холодильнике могут быть стабильны не менее 4 месяцев.

A7.6.2 Реагенты

Любой из трех консервантов можно использовать:

- Формалин: 10% (v/v) формальдегид. К 27 мл дистиллированной воды добавить 10 мл 37% (v/v) формальдегида.
- Азид (Jørgensen et al., 2001): 3 моль/л азид натрия (NaN_3). Растворите 19,5 г NaN_3 в 100 мл дистиллированной воды.
- Раствор для предотвращения агглютинации (agglutination-preventing solution, APSIS) (Brazil et al., 2004). К 100 мл дистиллированной воды добавить 1,0 г бычьего сывороточного альбумина (BSA), 2,0 г поливинилпирролидон (PVP), 0,90 г хлорида натрия (NaCl), 0,1 мл детергента Triton X-100, 0,004 мл силиконового антигенного агента и 0,10 г азида натрия. Тщательно перемешайте и отфильтруйте через фильтр с порами 0,45 мкм для удаления дебриса. Храните при температуре 4°С.

Важно: Бактерицидный азид натрия можно удалить из APSIS для того, чтобы сделать раствор нетоксичным. Однако такие растворы следует утилизировать, если они контаминированы.

A7.6.3 Дополнительные расходные материалы

Кроме обычного оборудования для оценки концентрации сперматозоидов при приготовлении образцов для КК потребуют следующее:

- Криовials или другие небольшие пробирки с плотно прилегающими крышками для хранения;
- Перманентный маркер для маркировки пробирок.

A7.6.4 Процедура

1. Отберите образцы спермы с подходящей концентрацией. Объем необходимой спермы для хранения будет сильно варьировать в зависимости от нужд лаборатории; либо используйте весь объем доступной спермы, либо приготовьте 4 мл суспензии разведенной спермы каждой концентрации.

2. Как можно быстрее после сбора спермы разведите образец консервантом. Если используется APSIS, чем больше времени проходит после разведения, тем больше шанс формирования кристаллов в разведенном препарате. Эти кристаллы могут мешать заполнению камеры и подсчету сперматозоидов.
3. Поместите требуемый объем спермы в 15-мл центрифужную пробирку. На каждый мл спермы добавьте 100 мкл 10% (v/v) формалина, 10 мкл 3 моль/л азиды или 1 мл APSIS.
4. Маркируйте все виалы, используемые для хранения образцов, информацией об образце и датой. Крышки следует убрать, а виалы поместить в штатив для быстрого и простого заполнения.
5. Убедитесь, что разведенный хранимый образец спермы тщательно перемешан, чтобы все виалы имели одну и ту же концентрацию. Даже небольшая задержка после перемешивания позволит сперматозоидам начать оседать, что изменит концентрацию аликвот. Один из способов поддерживать постоянное перемешивание — поместить центрифужную пробирку с разведенной спермой в штатив и постоянно пипетировать ее одной рукой с помощью пластиковой пипетки, при этом другой рукой осуществлять взятие аликвоты.
6. В зависимости от нужд лаборатории каждая виала может содержать 0,5–1,0 мл. Хранение образцов в аликвотах по 0,5 мл позволяет выполнить несколько расчетов из каждой виалы.
7. После заполнения всех виал разведенной спермой, они должны быть плотно закрыты крышками. В зависимости от типа используемых виал крышки могут быть уплотнены с помощью лабораторной пленки. В этом нет необходимости при использовании криовиал.
8. Повторите весь процесс с остальными образцами спермы.
9. Храните виалы при температуре 4°С.

Важно: Концентрацию растворов для внутреннего КК следует определять после того, как они приготовлены, не следует оценивать концентрацию нативного препарата. Как только суспензия хранящейся спермы приготовлена, виалу следует убрать (см. Разделы 2.7 и 2.8). Результаты можно свести в график, используя метод, описанный в Разделе 7.7. Все подсчеты следует производить, согласно методу, обычно используемому в лаборатории. Раздел ниже описывает процедуру использования гемоцитометра.

A7.6.5 Использование образцов, хранящихся для внутреннего контроля качества

- Хранящиеся растворы должны быть в дальнейшем разведены до процедуры подсчета; разведение будет зависеть от используемого консерванта.
- Первоначальное разведение спермы формалином и азидом минимально, поэтому нет необходимости проводить подсчет. Сперму, хранимую с APSIS, первоначально разводят в два раза (то есть 1 + 1 (1:2)), и это должно учитываться при расчете финальной (конечной) концентрации.

- Для суспензии, разведенной в APSIS, с первоначальной концентрацией около 25×10^6 /мл расчет лучше производить при дальнейшем разведении $1 + 9$ (1:10). Это можно получить, добавив 50 мкл хранящейся суспензии спермы к 450 мкл дистиллированной воды. Это даст конечную концентрацию сперматозоидов 1:20. Не используйте APSIS для разведения, так как это помешает сперматозоидам осесть на сетке гемоцитометра.
- Для следующих шагов все пипетки должны быть с установленным объемом и с чистым наконечником для быстрого взятия аликвоты сразу же после перемешивания.
- Следует приготовить виалы с соответствующим объемом воды для разведения (то есть 450 мкл, если требуется разведение 1:10, как описано выше). Контейнер с суспензией спермы следует хорошо перемешать с помощью вортекса в течение 30 сек на максимальной скорости. Следует взять аликвоту спермы 50 мкл и перенести ее в виалу с водой. Затем это виалу следует поместить в вортекс и прокрутить в течение 20 сек на максимальной скорости. Гемоцитометр следует заполнить 10 мкл суспензии и подсчитать сперматозоиды, как описано в Разделе 2.8.2 и 2.8.3.
- Если для хранения используется нативная сперма с истинной концентрацией, она должна быть низкой; разведение при подсчете рассчитывают с учетом предыдущего разведения. Например, если истинная концентрация спермы была в диапазоне $4-25 \times 10^6$ в мл, для создания конечной концентрации 1:5, как в лаборатории, должно быть проведено дополнительное разведение спермы, хранимой с APSIS, в соотношении 2:5 (2 + 3: так как сперма уже была разведена в соотношении $1 + 1$ (1:2) с помощью APSIS). Этого можно достигнуть добавлением к 50 мкл хранящейся спермы 75 мкл дистиллированной воды.
- Суспензия спермы, хранящаяся в холодильнике, стабильна в течение не менее 4 мес, в течение этого времени готовятся новые растворы. Желательно иметь период, во время которого и старые, и новые препараты анализируются для контроля переходного периода.

A7.7 Приготовление предметных стекол для внутреннего контроля качества при оценке морфологии сперматозоидов

A7.7.1 Общие положения

- Мазки можно приготовить в лаборатории для нужд внутреннего КК оценки морфологии и процедуры окрашивания.
- Разнообразные мазки могут быть приготовлены из различных образцов спермы, представляющих весь диапазон морфологии сперматозоидов, оцениваемых в лаборатории.
- Мазки можно фиксировать и хранить для дальнейшего контроля окрашивания и процедуры анализа.
- Окрашенные мазки можно использовать индивидуально или при повторном анализе морфологии сперматозоидов для КК.

- Использование повторов позволяет определить точность оценки конкретного лаборанта. Такие препараты КК также полезны для сравнения результатов, полученных от разных лаборантов внутри лаборатории или при сравнении анализов между лабораториями.
- Окрашенные по Папаниколау и заключенные в гистологические среды мазки, хранящиеся в темноте при комнатной температуре, могут оставаться стабильными в течение нескольких месяцев и даже лет.
- Эякулят должен быть хорошо перемешан на протяжении всего процесса приготовления мазков для того, чтобы все мазки одного образца имели одинаковую концентрацию. Любое отклонение, обнаруженное во время проведения анализа, как предполагают, является результатом процесса, подлежащего контролю (то есть процедуре оценки морфологии сперматозоидов), а не быть вызванной неправильным перемешиванием спермы во время приготовления мазка.

A7.7.2 Процедура

1. Переместите образец спермы из контейнера в 15-мл центрифужную пробирку. Это позволит проще и более тщательно перемешать образец во время приготовления мазка.
2. Энергично очистите обе поверхности предметных стекол от инея мягкой безворсовой салфеткой.
3. Нанесите маркировку на предметное стекло с информацией об образце (то есть идентификационный номер пациента и дату) карандашом мягкости HB (номер 2). Маркировка карандашом устойчива при фиксации и окрашивании по Папаниколау; не используйте маркировку чернилами или маркером.
4. Присоедините чистый наконечник к пипетке и установите объем 10 мкл (или объем, используемый при рутинной оценке спермы в лаборатории в процессе приготовления мазка спермы).
5. Сперма должна быть тщательно перемешана во время всего процесса выполнения мазка, что гарантирует одинаковое качество всех приготовленных препаратов. После перемешивания даже небольшая пауза до взятия аликвоты позволит сперматозоидам осесть, изменив тем самым популяцию сперматозоидов на предметном стекле.
6. Тщательно перемешайте образец в центрифужной пробирке путем аспирирования спермы 10 раз в пипетку с широким отверстием (приблизительно 1,5 мм в диаметре), уравновешенную до температуры образца. Процесс следует проводить энергично для тщательного перемешивания спермы, но без формирования пузырьков воздуха.
7. Сразу же после перемешивания, чтобы не позволить сперматозоидам осесть в суспензии, поместите 10 мкл эякулята на чистый конец предметного стекла. Важно не позволять капле спермы оставаться на предметном стекле больше пары секунд до размазывания.
8. Размажьте аликвоту спермы по поверхности предметного стекла согласно описанной технике (см. Раздел 2.13.2). При выполнении этой процедуры конец второго стекла используют для растяжения капли

спермы вдоль поверхности стекла. Контролируйте натяжение спермы вдоль поверхности предметного стекла: не совершайте толчков при движении вдоль стекла. Тщательность необходима, чтобы приготовить мазок малой толщины, иначе могут возникнуть наложения клеток, скручивания сперматозоидов и более темное окрашивание фона. Отделение сперматозоидов на предметном стекле зависит от объема спермы и ее концентрации, угла наклона шпателя в процессе приготовления мазка (чем меньше угол, тем тоньше мазок) (Hotchkiss, 1945) и скорости растягивания капли (более быстрое движение, толще мазок) (Eliasson, 1971).

9. Повторите пункты 6–8 для остальных предметных стекол, создавая только один мазок после перемешивания эякулята, чтобы избежать осаждения сперматозоидов. Если возникает пауза более пары секунд после перемешивания, сперму следует еще раз перемешать перед взятием аликвоты.
10. Если методика приготовления мазка отлажена, после каждого перемешивания можно приготовить 2–3 мазка. Аликвоты следует забирать сразу же после перемешивания, 2–3 мазка готовят сразу же настолько быстро, насколько это возможно, желательно в течение нескольких секунд.

A7.8 Калибровка оборудования

- Пипетки, счетные камеры и другое оборудование следует калибровать каждые 6–12 месяцев.

A7.8.1 Весы

- Весы следует проверять регулярно с помощью внутреннего калибратора и проводить внешнюю калибровку по время регулярного сервисного обслуживания.
- Калибруйте весы с помощью взвешивания стандартных весов (то есть 1, 2, 5 и 10 г для покрытия диапазона, используемого при взвешивании спермы).
- Повторите измерения 10 раз и вычислите среднее, среднеквадратичное отклонение (SD) и коэффициент вариации (CV) ($= 100 \times SD/\text{среднее}$).
- Оцените точность (которая обуславливает разброс весов внутри интервала $2SD$ от измеряемого среднего).

A7.8.2 Пипетки

- Калибруйте пипетки путем аспирирования дистиллированной воды до градуировки и сбрасывания ее в тару для взвешивания.
- Рассчитайте аспирированный объем по весу воды, исходя из плотности 1 г/мл.

Важно: Плотность воды уменьшается с температурой (Lentner, 1981). Она равна 0.9982 г/мл при 20°С, 0.9956 г/мл при 30°С и 0.9922 г/мл

при 40°С. Однако для калибровки оборудования допустимо значение 1,0 г/мл.

- Повторите измерения 10 раз и вычислите среднее, среднеквадратичное отклонение (SD) и коэффициент вариации (CV) ($= 100 \times SD/\text{среднее}$).
- Оцените точность (которая обуславливает разброс объемов внутри интервала 2SD от измеряемого среднего).

А7.8.3 Глубина камер

- Измерьте глубину камеры, используя нониусы на фокусе точной настройки микроскопа. Сфокусируйтесь сначала на сетке камеры, а затем на чернильной точке вне покровного стекла. Измерьте число делений между двумя точками.
- Повторите измерения 10 раз и вычислите среднее, среднеквадратичное отклонение (SD) и коэффициент вариации (CV) ($= 100 \times SD/\text{среднее}$).
- Оцените точность (которая обуславливает разброс глубин внутри интервала 2SD от измеряемого среднего).

А7.8.4 Инкубаторы

- Температуру в инкубаторе и нагревательных поверхностях следует проверять с помощью термометра, который, в свою очередь, регулярно калибруется.
- Смесь CO₂ следует проверять ежедневно по показаниям инкубатора, с помощью другого газового анализатора еженедельно либо ежемесячно и взятием газовой пробы во время сервисного обслуживания.

А7.8.5 pH бумага

- Следует проверять по известным стандартным pH.

А7.8.6 Другое оборудование

- Остальное лабораторное оборудование и реагенты, такие как pH-метр, следует также проверять раз в 3–6 месяцев.

Литература

- Armitage P et al. (2002). *Statistical methods in medical research*. Oxford, Blackwell Science.
- Brazil C et al. (2004). Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *Journal of Andrology*, 25:645-656.
- Eliasson R (1971). Standards for investigation of human semen. *Andrologia*, 3:49-64.
- Hotchkiss RS (1945). *Fertility in man*. London, William Heineman Medical Books.
- Jørgensen N et al. (2001). Regional differences in semen quality in Europe. *Human Reproduction*, 16:1012-1019.
- Lentner C (1981). *Geigy scientific tables*. Vol. 1: Units of measurement, body fluids, composition of the body, nutrition. Basel, Ciba-Geigy.

ПРИЛОЖЕНИЕ 8 Национальные программы внешнего контроля качества семиологического анализа

Австралия: Fertility Society of Australia, External Quality Assurance Schemes for Reproductive Medicine, PO Box 1101, West Leederville, Western Australia 6901, Australia

Дания: Dansk Institut for Ekstern Kvalitetssikring for Laboratorier, Sundhedssektoren, DEKS 54MI, Herler Universitets sygehjns, Herler Ringvej 75, 2730 Herlor, Denmark

Германия: QuaDeGA, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Universitätsklinikum, Domagkstrasse 11, D-48129 Münster, Germany

Италия: Valutazione Esterna di Qualita, Gruppo Controllo Qualita Analitico Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna, Italy

Швеция: NAFA (Nordic Association for Andrology), Andrology Unit, Reproductive Medicine Centre, Karolinska Hospital, PO Box 140, SE-171 76 Stockholm, Sweden

Испания: Centro de Estudio e Investigación de la Fertilidad (CEIFER), Granada, Spain

Англия: UKNEQAS Schemes for Andrology, Department of Reproductive Medicine, St Mary's Hospital, Manchester M13 0JH, United Kingdom

США: American Association of Bioanalysts Proficiency Testing Service, 205 West Levee, Brownsville, Texas 78520-5596, USA

Научно-практическое издание

Руководство ВОЗ
По исследованию и обработке
эякулята человека

ПЯТОЕ ИЗДАНИЕ

Перевод с английского *к.б.н. Н. П. Макаровой*

Научный редактор *д.б.н., проф. Л. Ф. Курило*

Подписано в печать 06.09.2012 г.
Формат 60×90/8. Гарнитура «PragmaticaC».
Печ. л. 38,5. Тираж 1000 экз. Заказ №

ЗАО «Издательство «КАПИТАЛ ПРИНТ»

е-mail: kapitalprint@mail.ru
Адрес сайта: www.informkorm.ru

Это руководство предназначено для научных сотрудников, лаборантов и руководителей, использующих семиологический анализ в клинической и исследовательской практике лаборатории.

Пятое издание предоставляет обновленные, обоснованные, подробные протоколы для рутинного, дополнительного, исследовательского анализа, с целью повышения качества и стандартизации семиологического анализа и повышения сопоставимости результатов, полученных в разных лабораториях.

Особенности нового издания:

- Легкий в использовании формат, который включил в себя подробную информацию по каждой процедуре.
- Дополнительный материал, объясняющий рассматриваемые методы и помогающий интерпретировать результаты;
- Множество подробных микрофотографий, приведенные для примеров различных форм аномалии сперматозоидов;
- Разделы о подготовке эякулята для исследования и его криоконсервации;
- Обоснованные референсные значения и референсные пределы различных характеристик (показателей) эякулята.



**World Health
Organization**



«Медико-генетический научный центр»
Российской академии медицинских наук

ISBN 978 5 905106 09 05



9 785905 106095 05