

Лабораторные методы обследования мужчин с нарушением репродуктивной функции



Липатова Н.А.

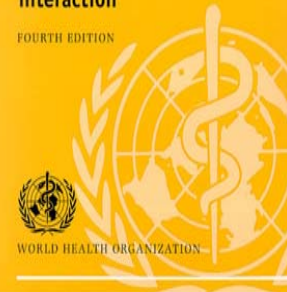
кандидат медицинских наук

ЗАО «Лаборатории ЦИР»

Г. Москва

WHO laboratory manual
for the examination of
human semen and
sperm-cervical mucus
interaction

FOURTH EDITION



Основные лабораторные методы исследования

- Морфологическое исследование эякулята
- Исследования антиспермальных антител (АСАТ)
- Оценка взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью *in vivo* и *in vitro*
- Биохимическое исследование эякулята

- Исследование эякулята проводят дважды с интервалом не менее 7 дней и не более 3 недель.
- Если результаты значительно различаются проводится дополнительный анализ
- Анализировать образец необходимо в течение часа после получения
- При низкой концентрации поступательно подвижных спермиев повторный образец исследуют как можно быстрее
- Исследование эякулята проводят однократно: при азооспермии у мужчин с маленькими размерами яичек с анамнезом или признаками врожденной патологии.

Нативный препарат. Простая световая или фазово-контрастная микроскопия

- концентрация, подвижность и агглютинация сперматозоидов, а также наличие других клеточных элементов и жизнеспособность сперматозоидов

Окрашенный препарат

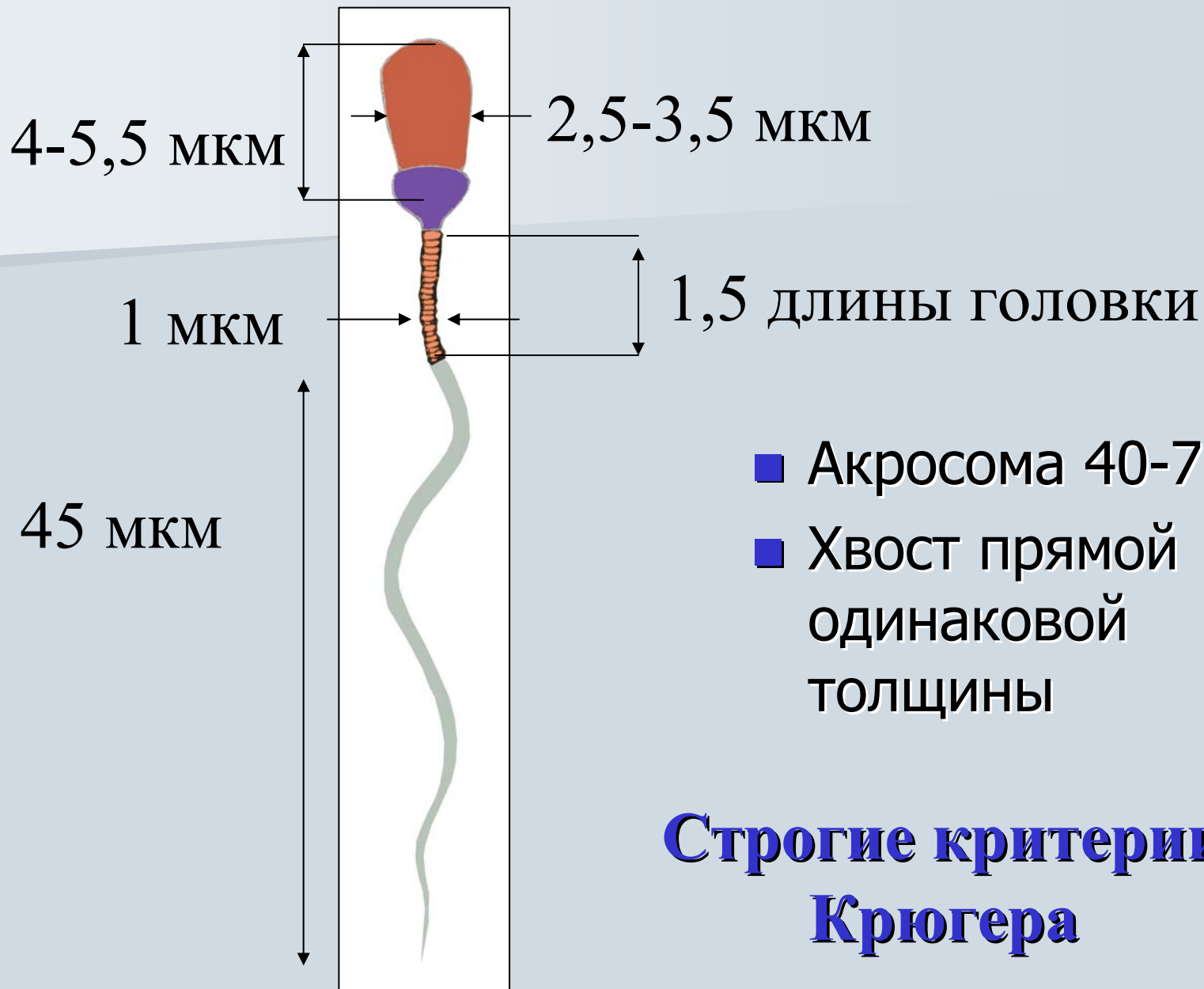
- морфологическая классификация сперматозоидов

МАР-тест

- выявляется наличие антиспермальных антител.

Классификация подвижности сперматозоидов (по WHO, 1999)

- a) **быстрое поступательное движение**
скорость > **20** мкм/с при 20°C
(примерно 4 длины головки или половина длины хвоста нормального сперматозоида)
- b) **медленное поступательное движение**
- c) **движение непоступательное** (по кругу или колебательное)
- d) **движение отсутствует**



Морфологические типы сперматозоидов

Morphologie des spermatozoïdes humains.

Têtes normales

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.



Anomalies de la tête

5. Macrocéphale
6. Microcéphale
7. Pyriforme
8. Tapering
9. Ronde (avec acrosome)
10. Ronde (sans acrosome)
11. Double tête (amorphe)
12. Amorphe
13. Amorphe
14. Amorphe
15. Amorphe
16. Amorphe



Anomalies de la pièce intermédiaire

17. Reste cytoplasmique
18. Angulation



Anomalies du flagelle

19. Double
20. Court
21. Enroulé
22. "
23. "
24. Absent
25. Angulé



Индекс тератозооспермии (ИТЗ) или индекс множественных аномалий (ИМА)

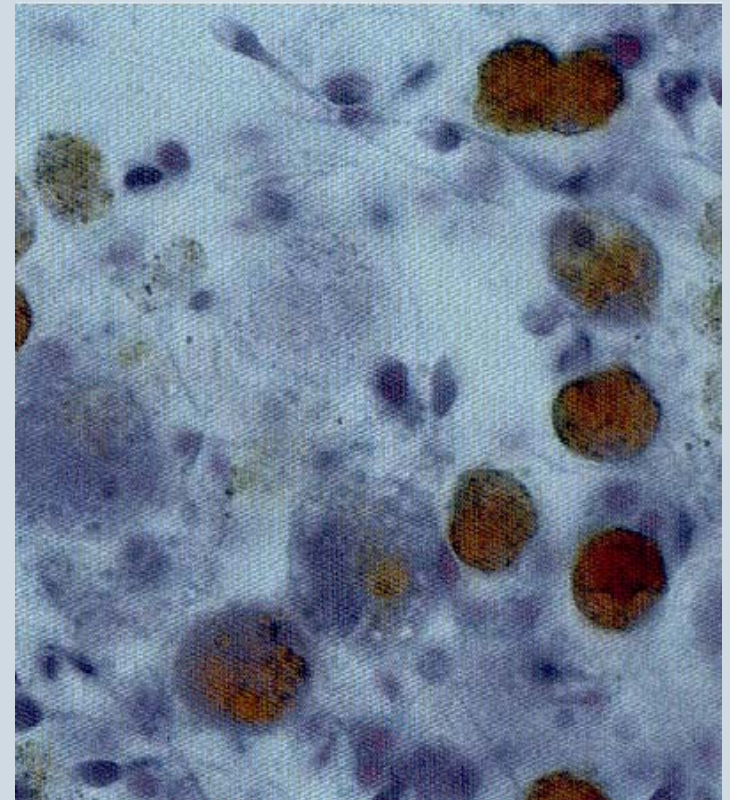
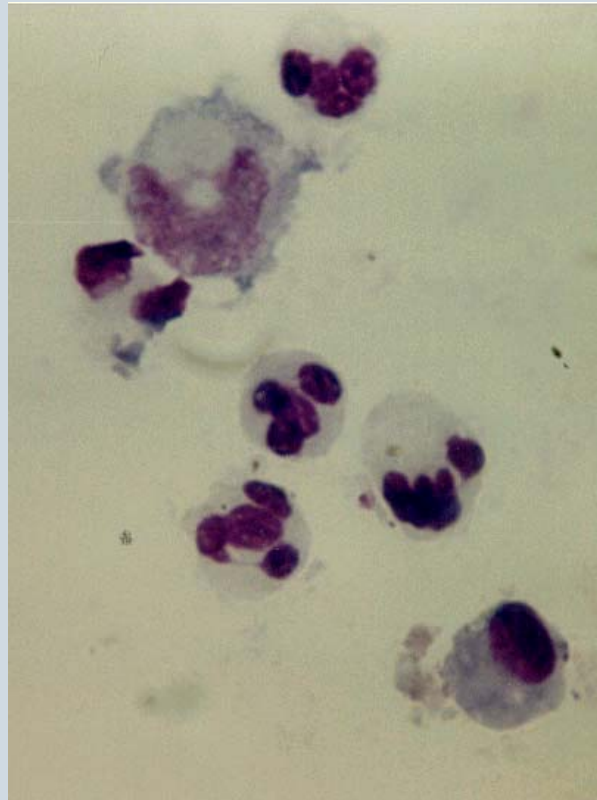
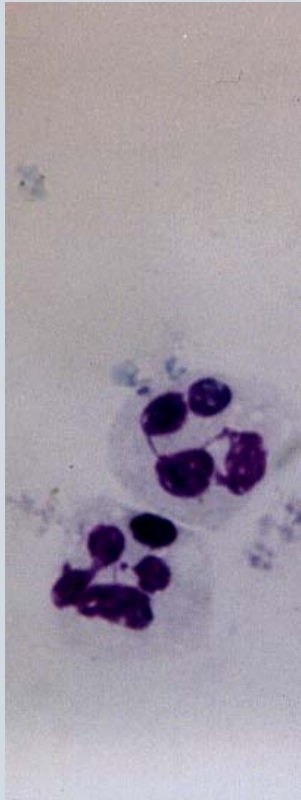
- ИТЗ = число дефектов, деленное на число патологических сперматозоидов
 - 1,00** - каждый патологический сперматозоид имеет только 1 дефект
 - 3,00** - каждый патологический сперматозоид имеет дефекты головки, средней части и хвоста
- ИТЗ более **1,6** происходит снижение частоты наступления беременности

Подсчет количества лейкоцитов

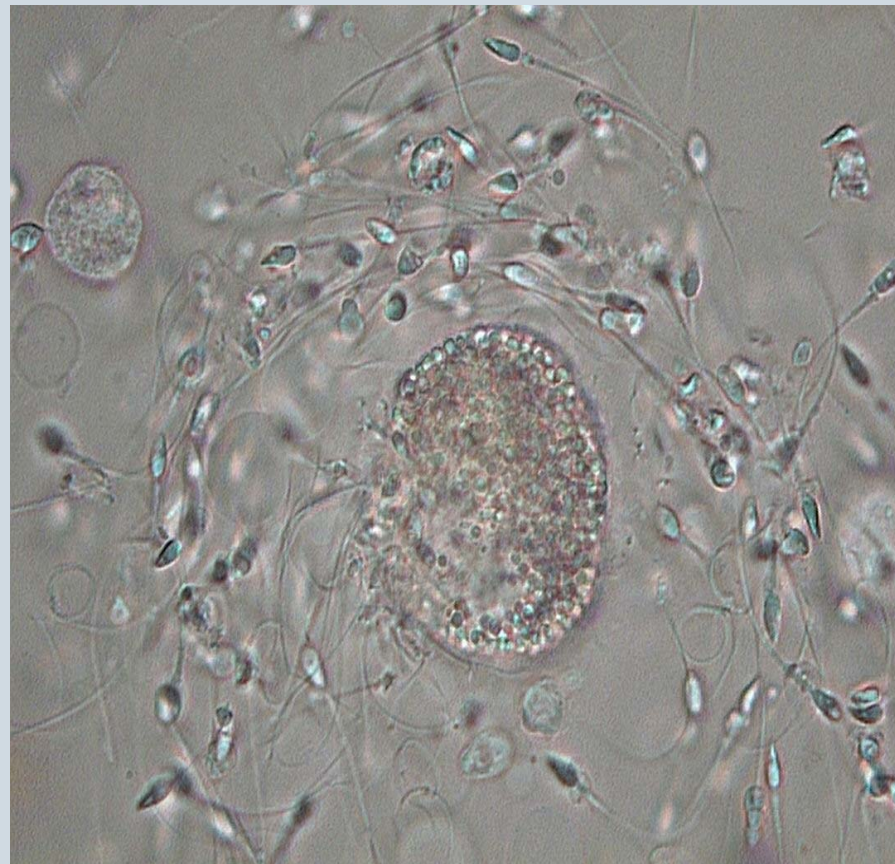
- Подсчет концентрации «круглых» клеток в счетной камере и вычисление процента каждого из типов (гранулоциты, незрелые сперматогенные клетки и др.) при микроскопии (x1200) окрашенного препарата
- Определение концентрации пероксидаза-положительных клеток в эякуляте (окраска с использованием орто-толуидина)
- Использование метода проточной цитофлуорометрии с применением моноклональных антител (CD45 и др.)

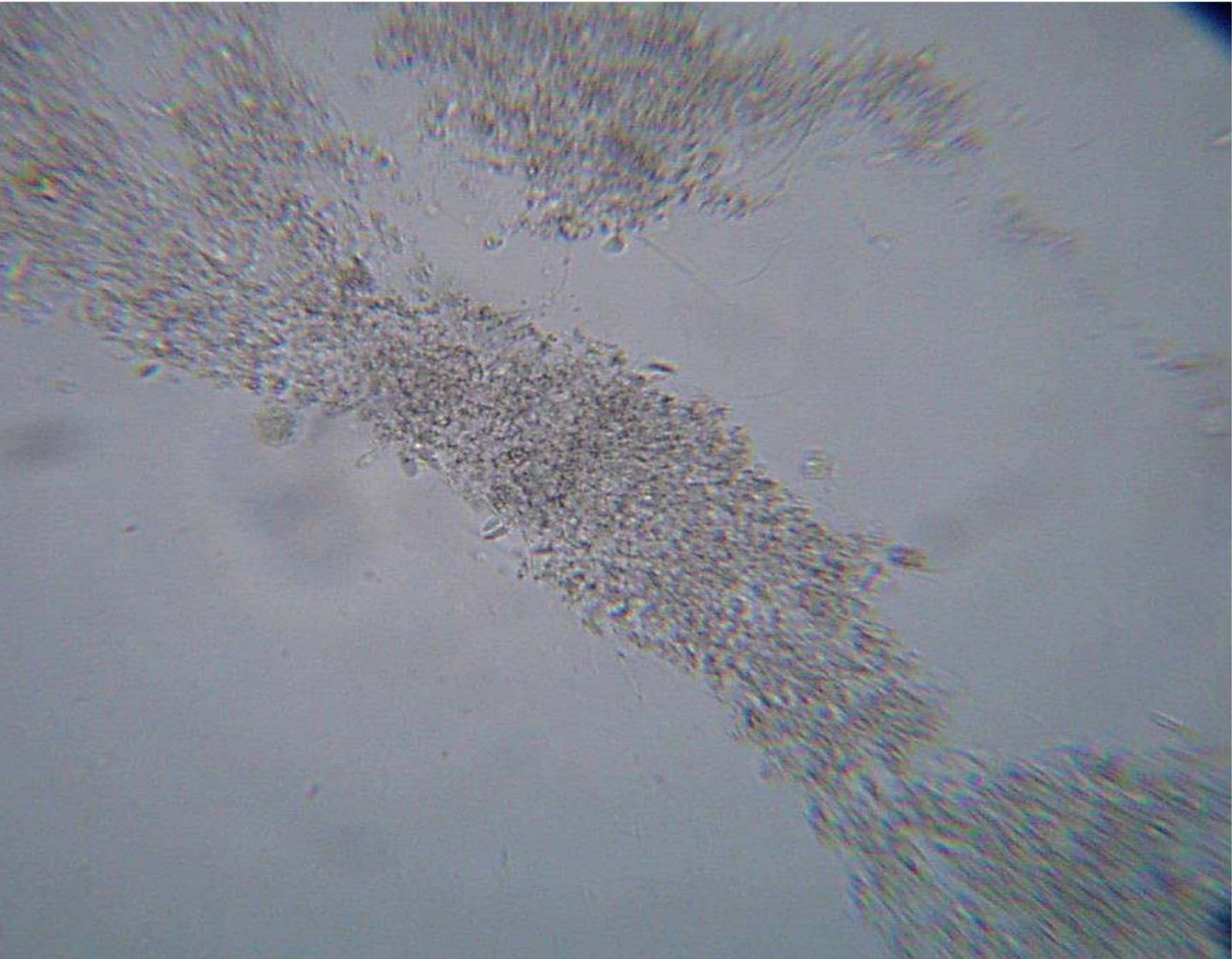
Дифференциальная диагностика пиоспермии

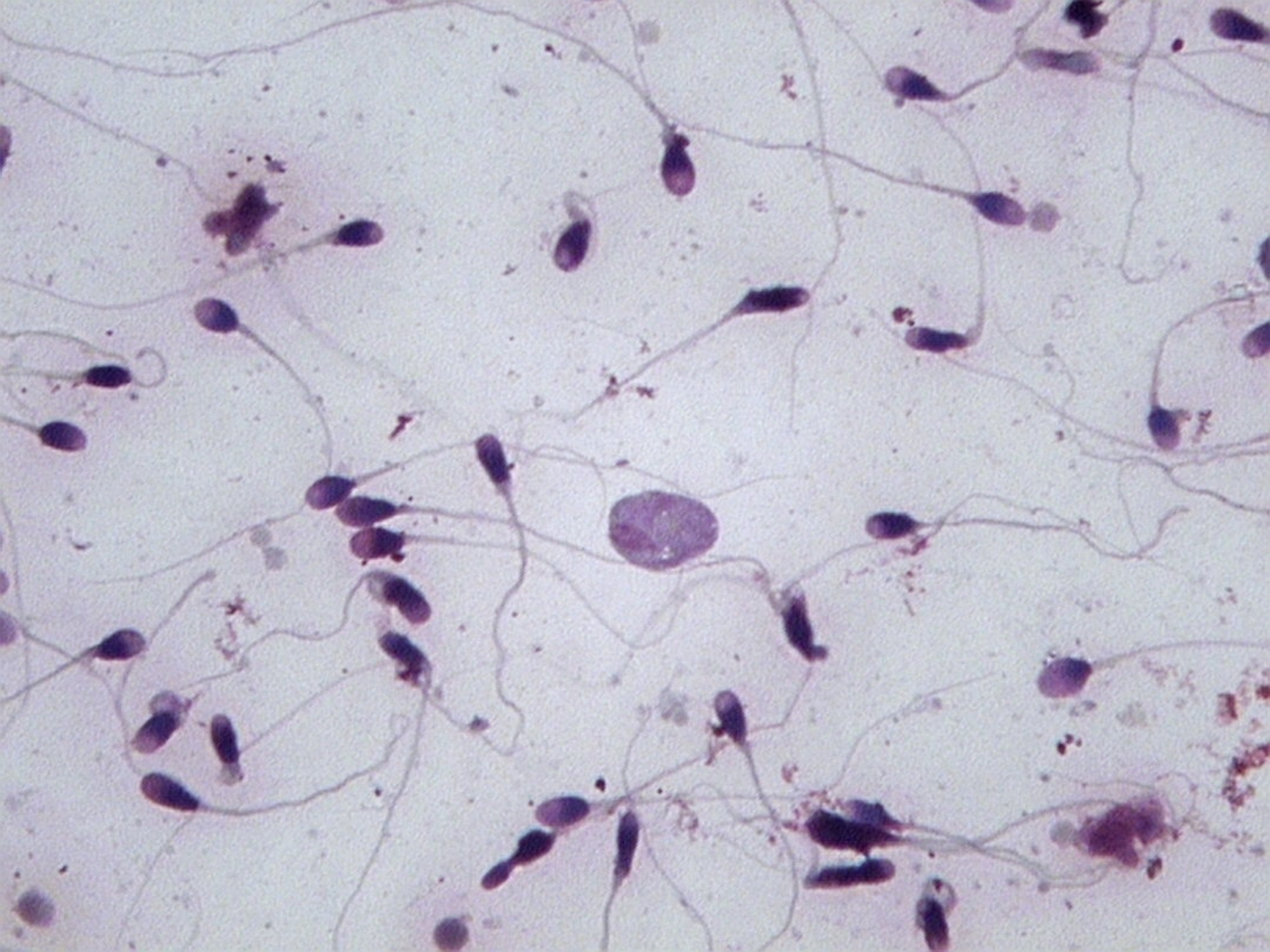
*окраска по Романовскому-Гимза (а, б)
и на миелопероксидазу (в)*



Макрофаги







Нормальные показатели спермограммы (*WHO, 1999*):

- Объем > 2 мл
- pH > 7,2
- Концентрация СПЗ* > 20 млн/мл
- Подвижность СПЗ > 50% подвижных («а+в»), или > 25% «а»
- Морфология * > 30% нормальных
- Жизнеспособность > 50% живых
- Лейкоциты < 1 млн/мл
- MAR-тест * < 50%

- 1992 году была опубликована статья, где были проанализированы более 60 научных работ за период с 1938 по 1990 гг. и, в частности, представлены данные по фертильности 14947 мужчин.
- Выявилось, что объём эякулята за этот период снизился с 3,40 до 2,75 мл, средняя концентрация сперматозоидов уменьшилась с 113×10^6 /мл до 66×10^6 /мл (Carlsen и соавт., 1992).
- Другая публикация анализирует показатели спермы 1351 фертильного донора за 20-летний период. Авторы показывают, что концентрация сперматозоидов у исследуемых лиц снижалась на 2,1% в год, подвижность сперматозоидов - на 0,6%, а количество патологических форм ухудшалось на 0,5% в год (Brake).

Параметры спермограммы у фертильных и субфертильных мужчин

	Фертильные		Субфертильные.		P_v
	Me	Range	Me	Range	
Сперматозоиды (млн/мл)	47.5	1 – 215	21.0	0 - 141	0.001
Сперматозоиды (млн/эякулят)	125	2 - 545	62	0 - 551	0.05
Прогрессивно-подвижных (a+b) (%)	57.5	0 - 85	48.5	0 - 85	0.01
Морфологически нормальных (%)	12.0	1 - 27	6.0	0 - 18	<0,001

Бесплодие:

- концентрация сперматозоидов менее 13,5 млн/мл
- подвижность менее 32%
- типичный вид менее (строгий критерий Крюгера) 9%

“Серая зона”:

- концентрация сперматозоидов 13,5 - 48 млн/мл
- подвижность 32 - 63%
- типичный вид 9 - 12%

Норма:

- концентрация сперматозоидов более 48 млн/мл
- подвижность более 63%
- типичный вид более 12%

Номенклатура некоторых вариантов показателей спермы по Eliasson et al. (*WHO, 1999*):

- Нормозооспермия - нормальный эякулят
- Олигозооспермия - концентрация СПЗ меньше 20 млн/мл
- Астенозооспермия - меньше 50% категории А + В или меньше 25% категории А
- Тератозооспермия - менее 30% с нормальной морфологией
- Азооспермия - нет сперматозоидов
- Аспермия - нет эякулята

АСАТ

- Результатом развития аутоиммунных реакций против сперматозоидов является появление антиспермальных антител (АСАТ)
- Частота АСАТ выше среди бесплодных популяций, чем у здоровых фертильных людей:

выявляются у мужчин с бесплодием (15-22%),
при этом в высоком титре всего у 6-7%

выявляются у бесплодных женщин (до 25%).

- Однако АСАТ могут встречаться и у мужчин с подтвержденной фертильностью

выявляются у здоровых мужчин (1-10%),

Типы АТ у бесплодных пар

- Агглютинирующие
 - Цитотоксические
 - Иммуобилизирующие

IgG

Имеют системное происхождение; проникают в репродуктивный тракт из циркулирующей крови

IgA

Синтезируются местно в репродуктивном тракте, могут покрывать сперматозоиды и обнаруживаться в семенной плазме

Ig M

Появляются при значительных повреждениях ГТБ

- Повреждение ГТБ открывает для иммунной системы доступ к ткани яичка, являющейся носителем антигенов, к которым в организме не выработана иммунологическая толерантность. Чаще всего барьер повреждается в области сплетения и семявыносящих канальцев.
- Другой причиной развития антиспермального иммунитета являются урогенитальные инфекции. Многие инфекции способны вызывать перекрестные реакции (антитела вырабатываются не только к возбудителям инфекции, но и к сперматозоидам). Наиболее значимыми являются хламидии, микоплазмы, вирусы герпеса и папилломавирус.

АСАТ

- нарушают функциональную целостность мембраны сперматозоидов.
У мужчин с антиспермальными антителами (как у мужчин с нормальными, так и субнормальными показателями спермограммы) часто наблюдается снижение показателей теста гипоосмотического набухания сперматозоидов, который сочетается со снижением оплодотворяющей способности эякулята.
- оказывают повреждающее действие на функцию предстательной железы, в частности на простасомы, органеллы, секретируемые ацинарными клетками предстательной железы.
- препятствуют продвижению сперматозоидов и их пенетрации через цервикальную слизь
- блокируют рецепторные участки на головке сперматозоида, ответственные за связывание с блестящей оболочкой яйцеклетки
- нарушают акросомальную реакцию, блокируя экзоцитоз кортикальных гранул

Методы определения АСАТ

МАР-тест

- необработанная сперма
- сыворотка крови (непрямой)
- определяет структуру против которой направлены АТ

Ограничения

- по числу и подвижности для прямого теста,
- для непрямого 10 млн/мл

Иммунобид

- отмытые сперматозоиды
- сыворотка крови (непрямой)
- определяет структуру против которой направлены АТ (более высокая чувствительность и специфичность)

Ограничения

- по числу и подвижности для прямого теста,
- для непрямого 5 млн/мл
- дополнительный этап – отмывка сперматозоидов

Латексный метод

- семенная плазма, цервикальная слизь, смыв из полости матки
- высокая чувствительность, возможность использования при азооспермии
- возможность определения у мужчин и женщин

Ограничения

- низкая специфичность
- не определяет АГ направленность

Иммуноферментный (ИФА)

- сыворотка крови, зякулят
- высокие чувствительность, воспроизводимость и специфичность
- возможность определения у мужчин и женщин

Ограничения

- АСАТ редко выявляются

Проточная цитометрия

- отмытые сперматозоиды
- сыворотка крови
- высокие чувствительность, воспроизводимость и специфичность
- возможность определения концентрации и АГ направленность АТ на мембране сперматозоидов

Ограничения

- Не используется в семенной плазме

Тесты взаимодействия с ЦС in vivo

(посткоитальный тест, проба Шуварского)

- Проводится возможно ближе к моменту овуляции
- Временной предел после коитуса 9 до 24 часов.
- Подвижность сз классифицируется по 4 категориям

Отрицательная:

- Нет сз/ сз (а+в)

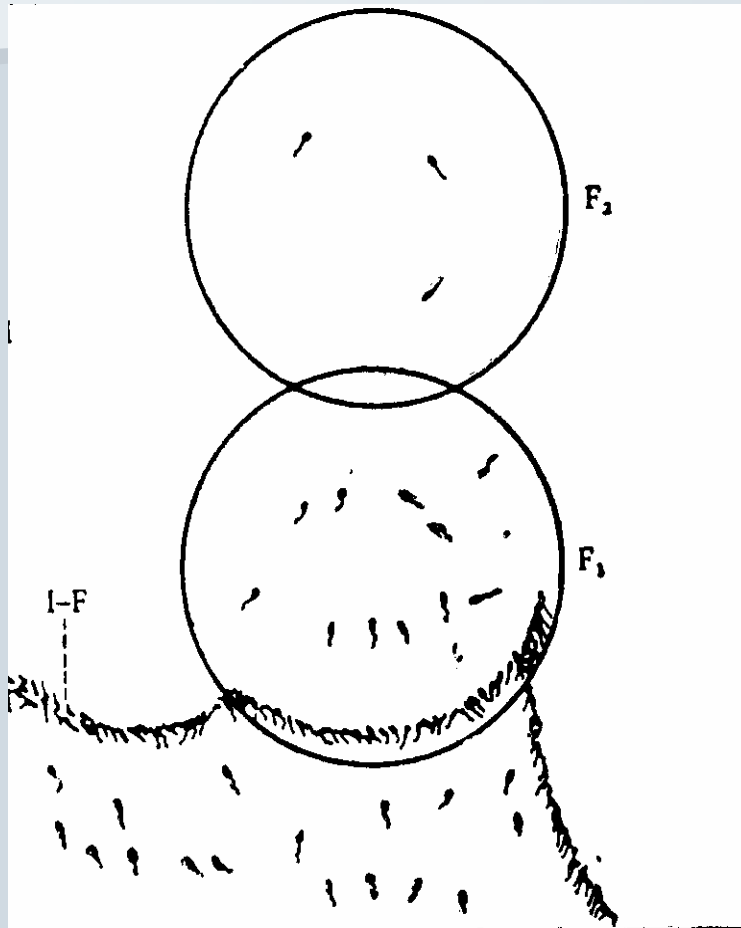
Слабоположительная:

- 1-10 (а+в) сз

Положительная:

- >10 (а+в) сз

Тесты взаимодействия с ЦС (in vitro)



Поступательно подвижных
сз:

■ положительный

> 15-20 F1 > 10 F2

■ слабоположительный

5 -14 F1 1-10 сз F2

отрицательный

нет сз F1, нет сз F2 или нет
поступательно подв сз

Биохимические показатели эякулята:

- **Цинк** более **2,4** мкМоль на эякулят
- **Лимонная кислота** более **13** мкМоль на эякулят
функциональное состояние предстательной железы и
эндокринной функции яичек
- **Фруктоза** более **13** мкМоль на эякулят
функциональное состояние семенных пузырьков
- **Нейтральная α -гликозидаза** более **20** мЕд на
эякулят
- **Карнитин** 0,5 моль/л
функциональное состояние придатка яичка

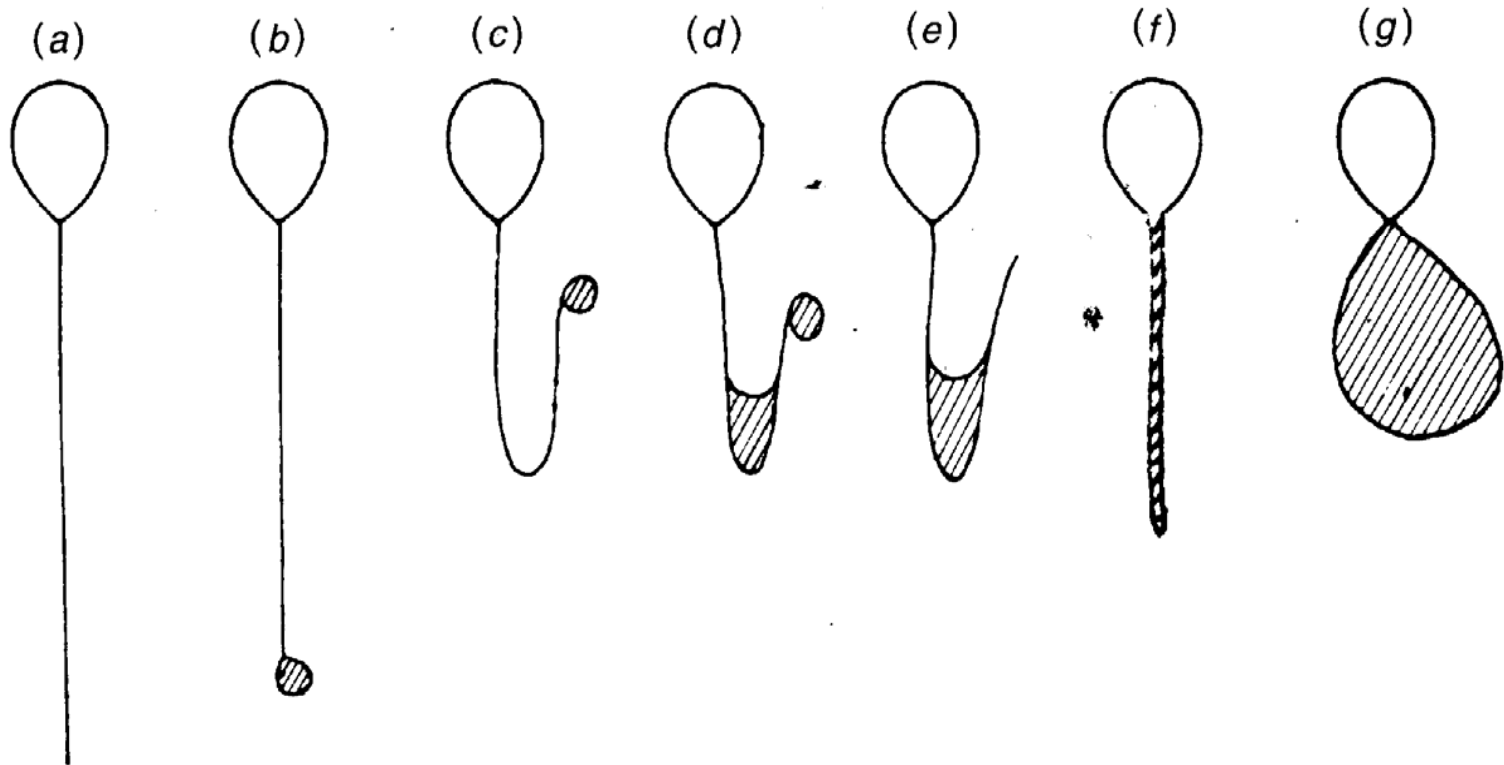
Специальные лабораторные методы исследования:

- гипо-осмотический тест;
- тест взаимодействия сперматозоидов с «беззоновым» ооцитом хомячка
- оценка акросомальной реакции;
- гормональные исследования;
- диагностика возбудителей инфекций репродуктивного тракта
- измерение активных радикалов кислорода в суспензии сперматозоидов;
- генетические исследования (AZF, AIS, PPS, NSI, PWS и др.);

Гипо-осмотический тест (HOS)

норма по WHO (1999) - более **50%** сперматозоидов

типа **(a)**

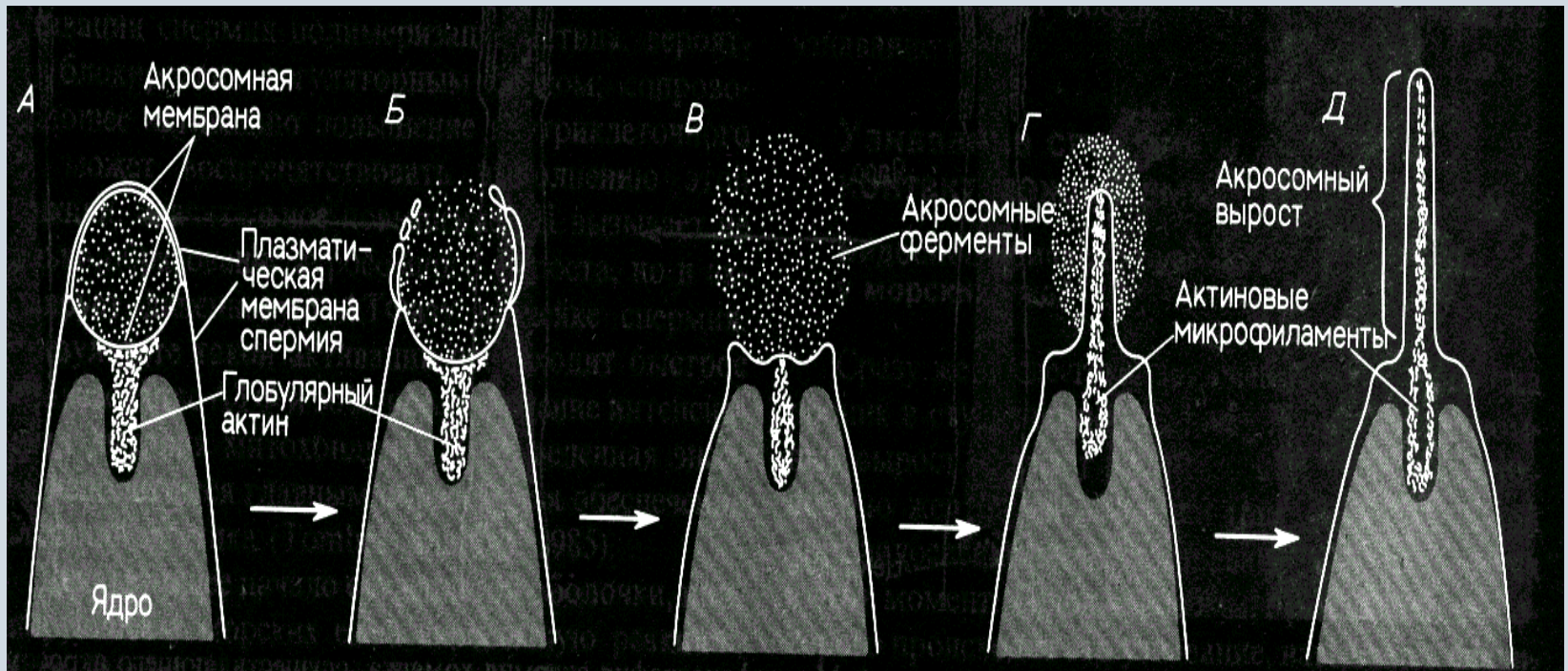


Тест взаимодействия сперматозоидов с «беззоновым» ооцитом хомячка

- Стимуляция гиперовуляции у самки хомячка
- Отмывание сперматозоидов пациента (методом флотации или центрифугирование в градиенте плотности)
- Инкубация сз со средой Эрлиха в инкубаторе CO₂ (капацитация сз)
- Подготовка яйцеклетки хомячка (удаляют фолликулярные клетки, блестящую оболочку)
- Инкубация яйцеклетки и суспензии капацитировавших сз 3 часа (CO₂)
- Оценка теста:
 - 1) есть/ нет проникновение сз в ооцит хомячка
 - 2) Возможность оценить хромосомы сз в зиготе ЧХ (хромосомы спирализуются и видны в микроскоп)

Акросомальная реакция

(схема по Гилберт, 1993)



Нормальная акросомальная реакция (ESHRE, 1996):

- Спонтанная реакция наблюдается менее чем у **20%** сперматозоидов
- Индуцированная реакция происходит не менее чем у **15%** сперматозоидов

Показания к гормональному обследованию мужчины:

Данные анамнеза, объективного обследования и вспомогательных диагностических методов, позволяющие заподозрить эндокринный генез патологии репродуктивной сферы;

Патологическая спермограмма.

Первичный гипогонадизм

- ↑ гонадотропинов
- ↓ тестостерона.

Вторичный гипогонадизм

- ↓ ЛГ, ФСГ и тестостерона.

Нормогонадотропный гипогонадизм

- ↓ тестостерона
- нормальный уровень ЛГ и ФСГ.

Гиперпролактинемия:

- Физиологическая
- Опухоли
- повреждение гипоталамуса
- лекарственные препараты группы антагонистов дофамина (фенотиазины, бутирофеноны)
- + ↓ ЛГ и ФСГ и тестостерона вторичная недостаточность гонад
- + ↑ ТТГ возможен гипотиреоз

ФСГ

В норме

- идиопатическая олигоастенотератозооспермия.

Повышен

- недостаток ингибина

Снижен

- возможно проведение эффективной терапии

Этапы обследования мужчин при ИРТ

Микроскопия:

мазок из уретры
сперма
секрет простаты
моча

- Исследование нативного препарата
- Окрашенного препарата:
по Грамму;
по Романовскому-Гимза;

Определение антител к инфекциям:

IgG, IgA, IgM

Определение ДНК

возбудителя:

- Метод ПЦР;
- Метод ДНК-зондов.

Определение поверхностных антигенов:

- РИФ;
- ИФА.

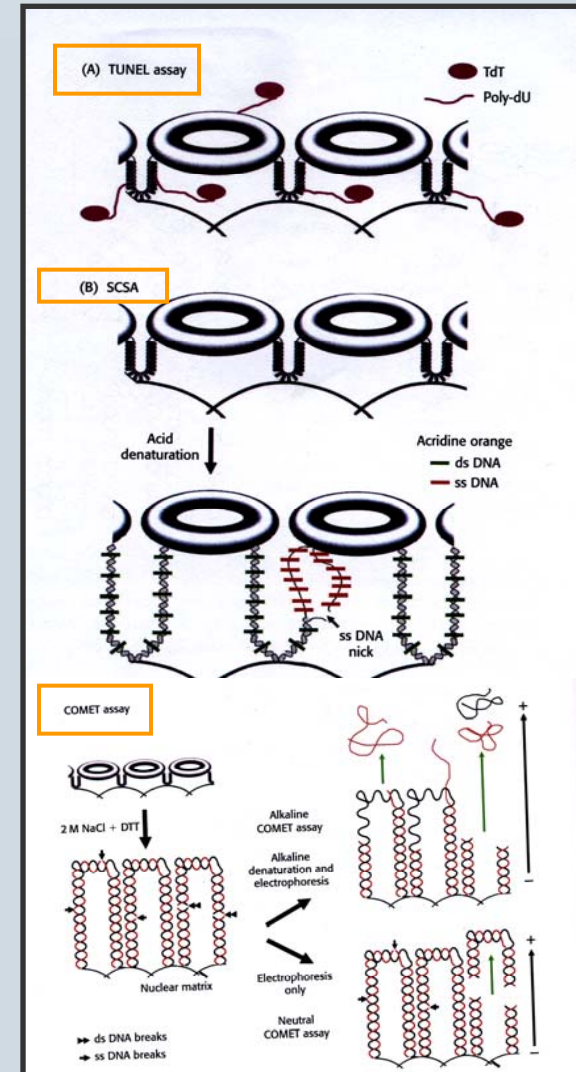
Посев на питательные среды

Показания к проведению генетического обследования

- выраженная патоспермия со снижением концентрации сперматозоидов ниже 5 млн./мл или азооспермия (фактор азооспермии AZF)
- снижение объема эякулята ниже 2 мл, смещение pH в кислую сторону, анэякуляции (отсутствие эякуляции при сохраненном оргазме) (гена цистозифброза)
- отсутствие подвижных сперматозоидов при их нормальной концентрации и жизнеспособности (синдром Картегенера, для которого также характерна выраженная патология со стороны дыхательных путей)
- высокая вязкость эякулята и выраженная олигозооспермия (азооспермия) (синдром Янга).

Структура хромосом сперматозоидов и методы ее оценки

- (A) **Метод TUNEL**, от terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling, - выявляет дефекты и разрывы в ДНК с помощью уридина на 3' OH конце (Sgonc, Gruber, 1998)
- (B) **Метод SCSA** (sperm chromatin structure assay) - выявляет ss и ds ДНК с помощью акридинового оранжевого и позволяет определить индекс фрагментации (Don Evenson et al., 1987)
- (C) **Метод COMET** – электрофорез фрагментов ДНК, полученных в нейтральных условиях (ds разрывы ДНК) и с помощью алкалина (ss разрывы ДНК) (Tomsu et al., 2002; McVicar et al., 2004)



- Установление конкретных патогенетических механизмов нарушения мужской репродуктивной функции позволяет шире использовать возможности специфической терапии, повысить ее эффективность и снизить стоимость.
- Избежать осложнений, при необоснованном назначении антибиотиков, гонадотропинов, андрогенов, глюкокортикоидов,
- Избежать осложнений у женщин, включенных в программу ЭКО, и врожденных уродств плода.

Спасибо за внимание!