

Сперматологические исследования в практике андролога в Екатеринбурге.

**Панков ВИ
«Клиника семейной медицины»
АО Медицинские технологии
2019**

Спермограмма — основной инструмент лабораторной оценки мужской фертильности

Объем эякулята 1,5 мл и более

pH эякулята 7,2 и более

Концентрация сперматозоидов более 15 млн/мл

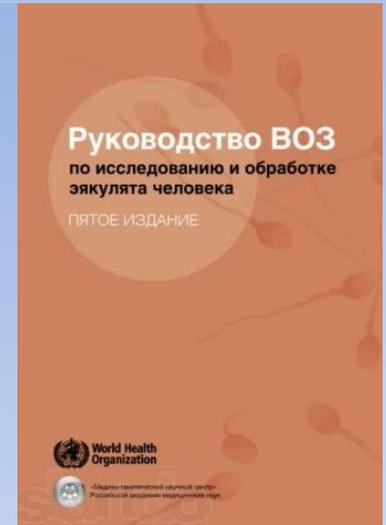
Общее количество сперматозоидов в эякуляте более 39 млн

Общая подвижность сперматозоидов(категории A+B+C) более 40%, из них с прогрессивной подвижностью (A+B) более 32%

Живых сперматозоидов более 58%

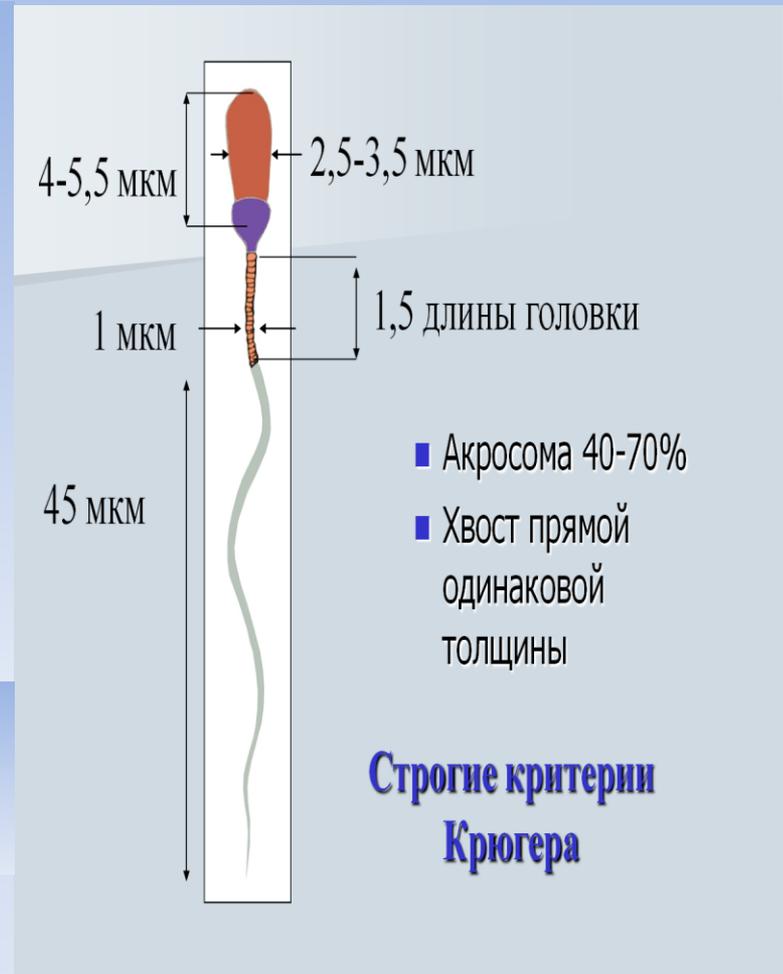
Морфологически нормальных сперматозоидов (по строгому критерию Крюгера) окраска по Папаниколау более 4%

Лейкоциты менее 1 млн/мл



Строгие критерии Крюгера

- Морфология сперматозоидов, выявляемых на уровне внутреннего зева матки.
- Морфология сперматозоидов, связанных с зоной пеллюцида.



Все пограничные и с не резко выраженной патологией формы головок относятся к патологическим.

Проблемы стандартизации сперматологических исследований

Критерии низкого качества исследования:

1. Бланк и предлагаемые нормы

2. Нормальных морфологических форм более 20%

3. Подсчет лейкоцитов в полях зрения

4. Стоимость исследования

 Клиника **НоваМед**
на службе у здоровья!

г. Екатеринбург,
пр. Ленина, 69
тел. 362-40-00
www.novamedclinic.ru

АНАЛИЗ СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ

ФИО _____ *Л. В.*

Время получения эякулята _____ Время исследования _____

Исследуемые параметры	Результаты	Норма
Объем эякулята (мл)	<i>2,8 мл</i>	2,0 - 3,0 мл
pH	<i>7,8</i>	7,2 - 8,0
Цвет	<i>белес-мутный</i>	Белесоватый
Консистенция	<i>60%</i>	Разжижение через 30 минут
Вязкость	<i>0,1 см</i>	Длина нити 0,1 - 0,5 см
Лейкоциты	<i>2-4 в поле зрения</i>	Меньше 1 млн в 1 мл
Флора	<i>отсутствует</i>	Отсутствует
ОЦЕНКА СПЕРМАТОЗОИДОВ		
Концентрация	<i>4 · 10⁶</i>	20 млн и более в мл
Общее количество в эякуляте	<i>10 · 10⁶</i>	40 млн и более
Подвижность	Категория А	Более 50% с прогрессивным движением вперед (А + В)
	Категория В	
	Категория С	
	Категория D	
Головки	<i>большая, тонкая</i>	Овальная, сплюснута
Морфология	Тела	Зрелые не имеют «воротничка»
	Хвоста	
Жизнеспособность	<i>40% живы</i>	75% живых
Агглютинация	<i>нет</i>	Отсутствует
Лецитиновые зерна	<i>+++</i>	Присутствуют
Прочее		

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: *Нормозоспермия, олигоспермия, тератозоспермия, астенозооспермия, полизооспермия, азооспермия, аспермия.*

Подпись _____ Дата *18 СЕН 2010*



ООО «Новомед» ИНН 7617083008 ОГРН 1047617083008

Проблемы стандартизации сперматологических исследований

1. Необходимость приобретения специализированного оборудования.

Стандартизованная спермограмма

Спемоанализатор SCA компании Microptic Automatic Diagnostic system Испания
1800000 рублей

«Ручная» спермограмма

- подготовленный специалист с опытом выполнения исследований
- микроскоп "MEIJI techno" 200 000 рублей
- камера Маклера 70 000 рублей

2. Необходимость приобретения набора специализированных реактивов (первичный набор 51440 рублей)

- набор Spermac Stain 150 определений 16 800 рублей (морфология)
- набор FertiCult Flushing (5 флаконов по 20 мл) 2900 рублей (подготовка к окраске)
- набор LeucoScreen 20 определений 4200 рублей
- набор VitaScreen 200 определений 4540 рублей (жизнеспособность сперматозоидов)
- SpermMar Test IgG и IgA 2 набора по 50 определений по 11 500 рублей каждый

3. Хронометраж исследования.

Опытный специалист выполняет исследование в течение 65 минут.

4. Исследование должно быть выполнено в течение 1 часа после забора эякулята.

Дальняя транспортировка исследуемого материала невозможна.

Проблемы стандартизации сперматологических исследований

Экономическая целесообразность стандартизованной спермограммы существует только у специализированных клиник, занимающихся лечением бесплодия или у аналогичных лечебных учреждений с бюджетным финансированием.

Вследствие значительных материальных и временных затрат на исследование - стоимость услуги не может быть низкой, если это не федеральное лечебное учреждение

Сперматологические анализаторы

Анализатор качества спермы Sperm Quality Analyzer-Visual (Medical Electronic System Ltd)

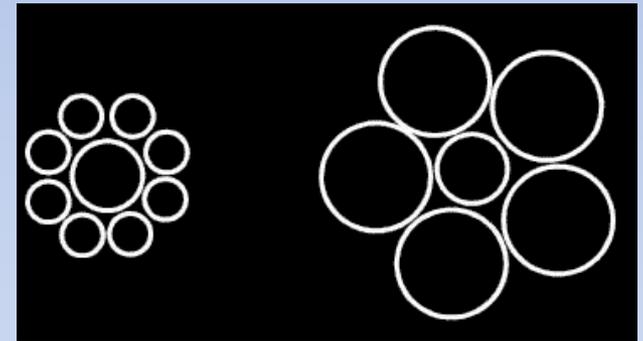
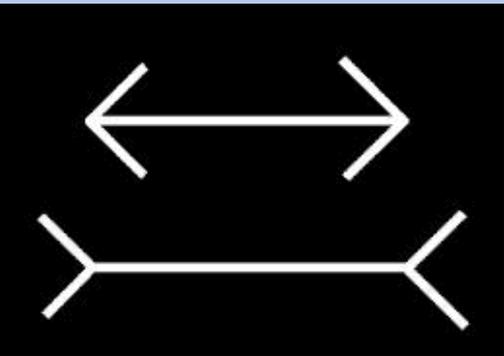


Анализатор Качества Спермы SCA® (Microptic Automatic Diagnostic system)



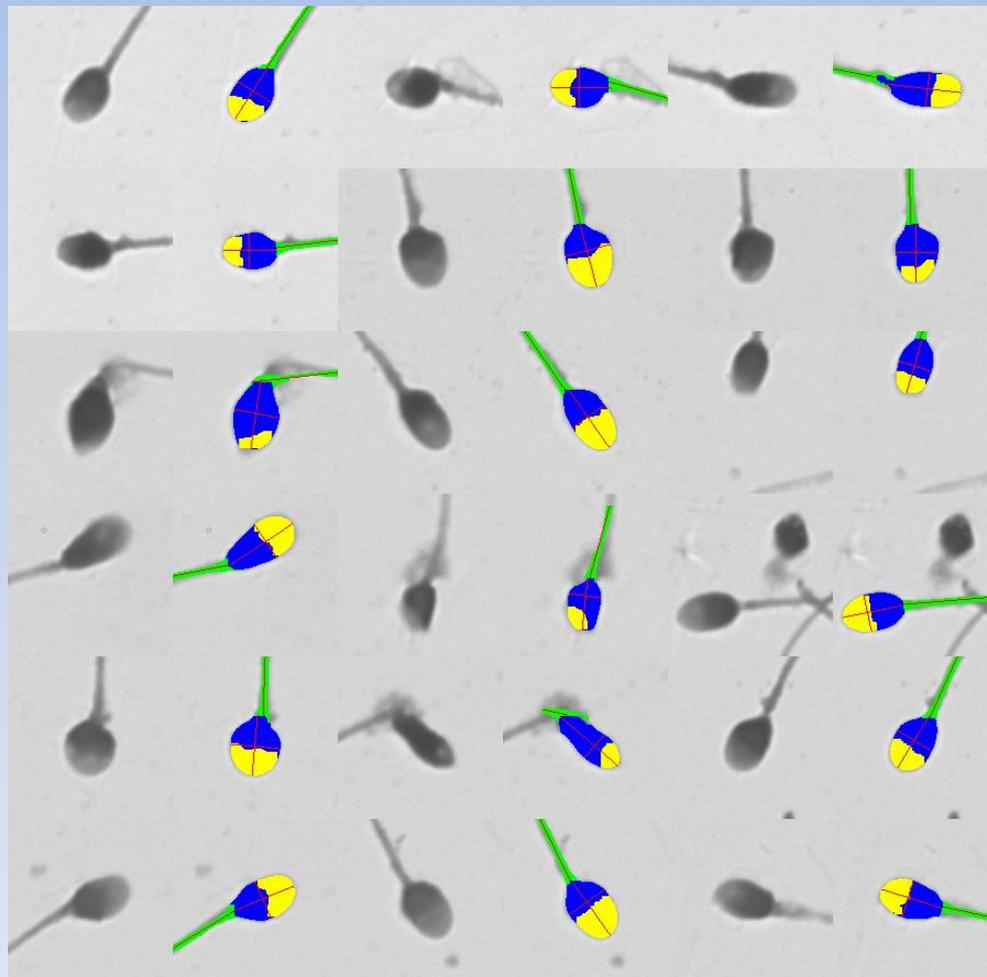
Анализатор Качества Спермы — SCA® (Microptic Automatic Diagnostic system)

Чем объективный анализ лучше субъективного



- Стандартизированный
- Независимый от оператора
- Единообразный

Анализатор Качества Спермы — SCA® (Microptic Automatic Diagnostic system)



Методы выявления АСАТ

На подвижных сперматозоидах

МАР- тест (mixed antiglobulin reaction Juger 1978)

Аналог ИВ-тест (immunobead assay Bronson 1984)

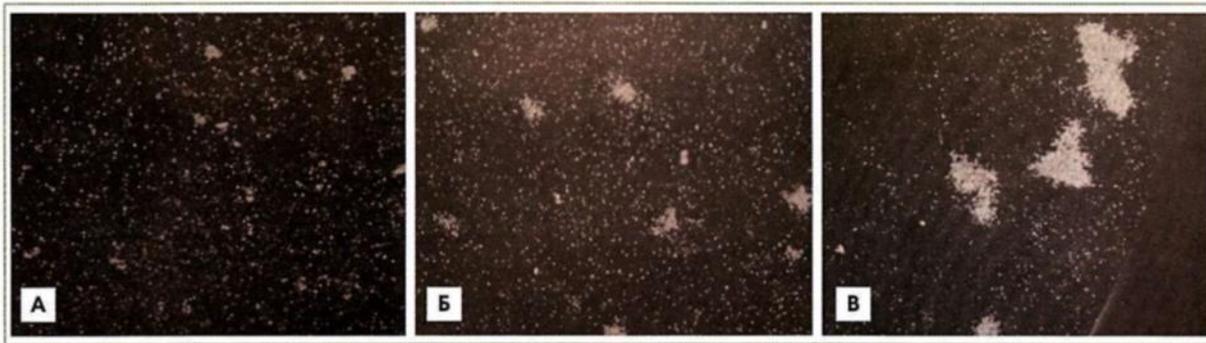


Рис. 162. Агглютинация сперматозоидов, вызванная антиспермальными антителами: А – реакция неспецифическая (агглютинация отсутствует), Б – слабовыраженная агглютинация, В – выраженная агглютинация, свидетельствующая о наличии АСАТ в сыворотке



На малоподвижных сперматозоидах

Тест латекс-агглютинации «Bioserv Diagnostics»

(тест положительный в разведении 1:100)

ИФА (Тест-набор Spermatozoa-Antibody-ELISA фирмы

IBL (норма 0-60 Ед/мл, тест положительный при значении > 100 Ед/мл)

«Лаборатория KDL»



Биохимические маркеры дополнительных половых желез

Придаток яичка: альфа- гликозидаза (Episcreen plus FertiPro)
Простата: лимонная кислота (Citric Acid Test FertiPro)
Семенные пузырьки: фруктоза (Fructose Test FertiPro)

Фотометрический тест
EPISCREEN PLUS фирмы FertiPro
на нейтральную гликозидазу
(норма > 20,0 mU/эякулят)
«Гемотест»



Диагностика фрагментации ДНК

HALOSPERM фирма Halotech Испания

Набор GoldCyto Sperm Kit фирма Goldcyto

Biotech corp (норма < 15%)

Метод основан на дисперсии хроматина ядра сперматозоидов и оценке светящегося ореола вокруг клетки в световом микроскопе.

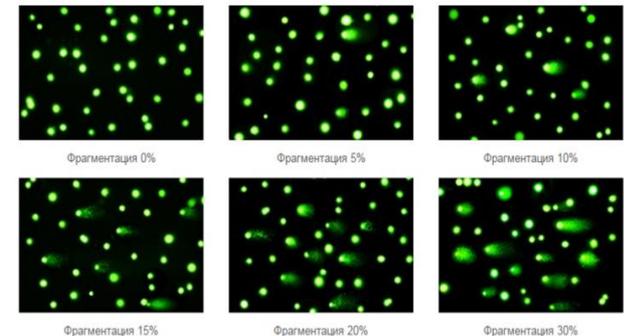
TUNEL (Transferase mediated dUTP Nick End Labeling)

(норма < 15%)

Метод TUNEL позволяет определить количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК с помощью прямой метки разрывов ДНК флюорохромом и измерение интенсивности люминесценции.

COMET ASSAY (норма < 20%)

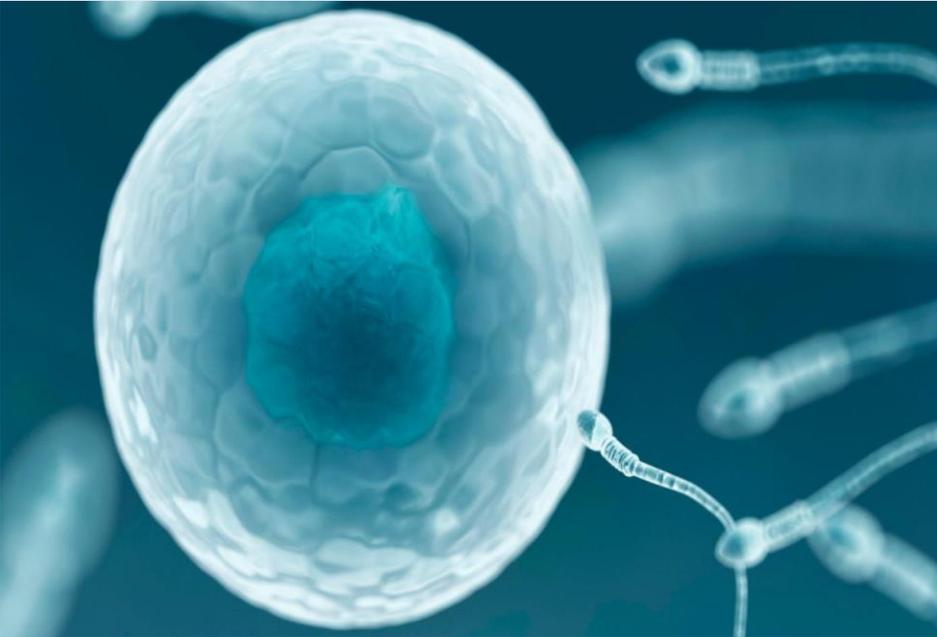
Гелевый электрофорез сперматозоидов в геле агарозы. На клетки воздействуют реагентами с целью экстракции гистонов и протаминов. Под влиянием электрического поля происходит миграция фрагментов ДНК к положительному электроду. При окраске ДНК-специфическими красителями создается эффект «кометы», где длина хвоста «кометы» и интенсивность сигнала отражают степень фрагментации ДНК.



Тест связывания сперматозоидов с гиалуроновой кислотой.

НВА Тест (The sperm-Hyaluronan Binding Assay)

Сперматозоиды обладающие высокой способностью к связыванию с гиалуронатом, демонстрируют завершение основных этапов сперматогенеза, высокую степень зрелости хроматина и имеют более низкий процент генетических аномалий.



Сперматозоиды, способные к связыванию с гиалуронатом в четыре раза реже несут однонитевые разрывы ДНК и имеют в 4-6 раз более низкую частоту хромосомной анеуплоидии.

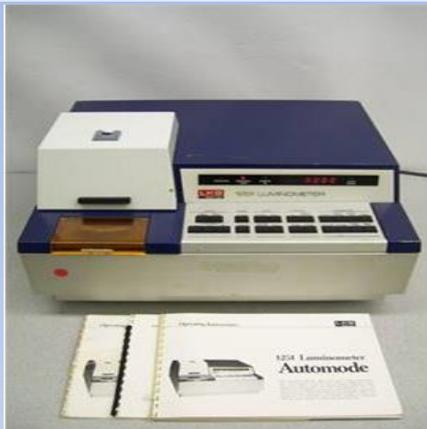
Индекс связывания с гиалуронатом.

Связывание более 80% - показатели зрелости и функциональной компетентности сперматозоидов в норме

Связывание менее 80% - показатели зрелости и функциональной компетентности сперматозоидов снижены

Методы исследования активных форм кислорода (АФК/ROS) и антиокислительной активности.

Люминометр LKB Wallac 1256



Хемилюминесценция- это свечение вещества в результате химических реакций (например, свечение фосфора при медленном окислении). Это явление используется для регистрации сверхслабых световых потоков люминофора, возникающих при биохимических реакциях, сопровождающихся образованием свободных радикалов.



Тест OxiSperm фирмы HalotechDNA Мадрид основан на химических свойствах нитросинего тетразолия, входящего в набор в виде реакционного геля, для оценки повышенного количества супероксидных радикалов, присутствующих в эякуляте.

Потенциометрический анализатор «Антиоксидант»
НИЦ СТ ФГБОУ ВПО «Уральский государственный
экономический университет»

Предназначен для определения общей антиоксидант/оксидантной активности образцов, которые могут быть переведены в раствор путем специальной пробоподготовки.

Электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов

В 1928- 1931 году был сконструирован электронный микроскоп. В середине XX века – сканирующий электронный микроскоп.

В РФ лидер в ЭМИС доктор биологических наук Брагина Елизавета Ефимовна (МГУ, НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского)

ЭМИС: тотальная патология (лечение невозможно).

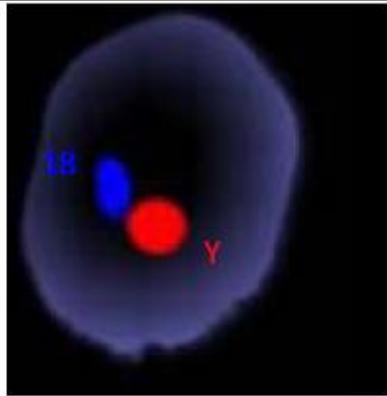
- Первичная цилиарная дискинезия при астенозооспермии.
(Поражение структуры аксонемы – микротрубочек и динеиновых ручек)
- Дискинезия фиброзного слоя при астенозооспермии.
(Разрушение вертикальных столбиков и поперечных ребер фиброзного слоя)
- Глобулозооспермия при тератозооспермии.
(Агенез акросомы)
- Синдром ацефалических сперматозоидов при тератозооспермии.
- Агенез митохондрий сперматозоидов при астенозооспермии.
- Аномалия строения проксимальной центриоли



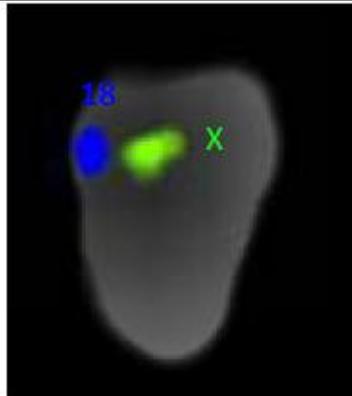
ЭМИС: Структура нормального сперматозоида

Молекулярно-цитогенетический анализ методом FISH (fluorescence in situ hybridization) для исследования уровня анеуплоидий сперматозоидов.

Нормальные сперматозоиды

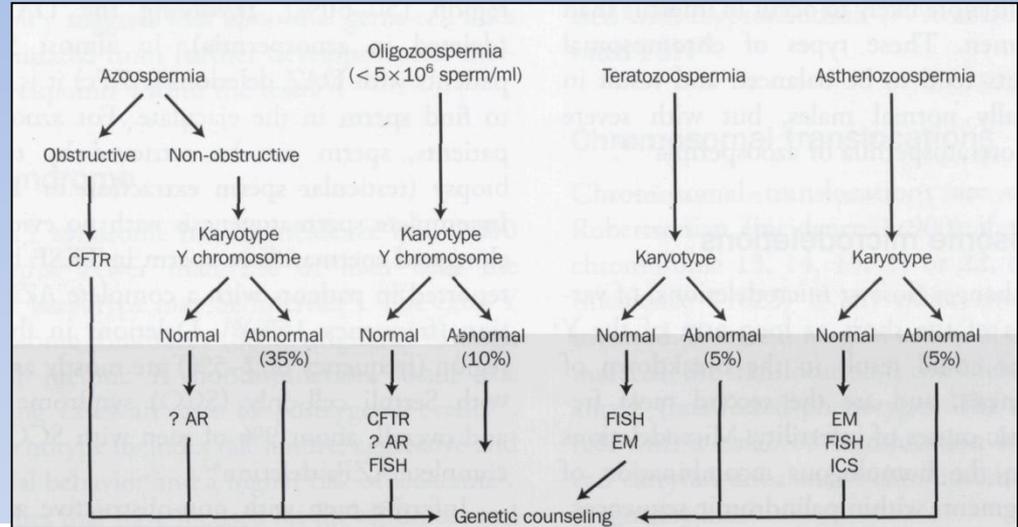


Y-несущий сперматозоид

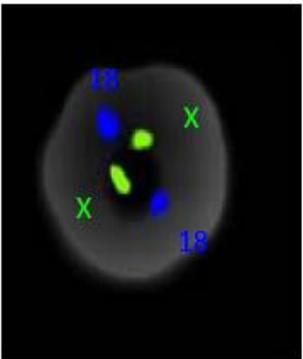


X-несущий сперматозоид

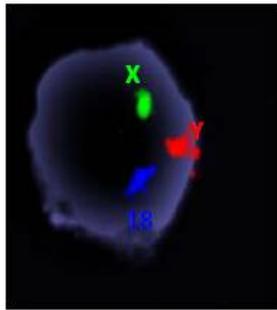
Алгоритм генетического обследования при мужском бесплодии. **Oehninger S.C., Kruger T.F. Male Infertility. Diagnosis and Treatment.- 2007**



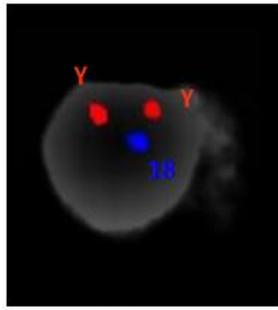
Анеуплоидные сперматозоиды



Дисомия хромосом 18,X



18,X,Y



18,Y,Y

По данным молекулярно-цитогенетического анализа методом FISH, уровень анеуплоидий в сперматозоидах не должен превышать 2,5 %
Carrell D. T. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises J Androl.,2008.

Наиболее часто встречаются: наличие двух 18-х хромосом, удвоение X-хромосомы, отсутствие одной из половых хромосом.

Многоцветная проба AneuVysion для хромосом X, Y, 18,13, 21 (Abbott-Vysis, USA)

Оценка результатов биопсии яичек по Johnsen

Фиксация препарата 5,5% глутаральдегидом, препарат готовят методом Holdstein and Wulfhekel с окраской толуидиновым синим/ пиронином или по Laczko и Levai.

10 баллов	Все генерации сперматогенных клеток	Интактный сперматогенез
9 баллов	Много поздних сперматид, дезорганизация эпителия	Гипосперматогенез
8 баллов	Небольшое количество поздних сперматид	Гипосперматогенез
7 баллов	Нет поздних сперматид, много ранних	Нарушение дифференцировки сперматид
6 баллов	Нет поздних сперматид, немного ранних	Нарушение дифференцировки сперматид
5 баллов	Нет сперматид, много сперматоцитов	Блокада созревая первичных сперматоцитов
4 балла	Нет сперматид, немного сперматоцитов	Блокада созревая первичных сперматоцитов
3 балла	Только сперматогонии	Блокада созревания сперматогониев
2 балла	Только клетки Сертоли	Синдром клеток Сертоли
1 балл	Эпителий в семенных канальцах отсутствует	Атрофия канальцев

Пример гистологического исследования по De Kretser and Holstein предоставленный Клиникой Гармония.

Показатель	Результат
Номер исследования	6170 (2 правое яичко)
Возраст	26
Исследуемый материал	ткань яичка
Анамнез, клинические данные: 1. ткань правого яичка 2. ткань правого яичка после эмбриологической обработки 3. ткань левого яичка после эмбриологической обработки	
Клинический диагноз: Первичное бесплодие. Секреторная азооспермия.	
Гистологическая характеристика биоптата	
Зародышевый эпителий, высота (мкм)	60
Зародышевые клетки	Дефекты сперматид: блокада сперматогенеза
Опухолевые клетки	не обнаружены
Просвет канальцев : < 180 мкм, с высвобождением зародышевых клеток с признаками незрелости в виде многоядерности и гиперхромии, без секвестрации клеток Сертоли, макрофагов, лимфоцитов	
Собственная пластинка: > 8 мкм, без фрагментации и дивертикулов	
Клетки Лейдига: Гиперплазия	
Лимфоциты	Очаговая слабо выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация
Внеклеточный матрикс: В обычном объеме, без интерстициального фиброза	
Артериолы	Стенка тонкая, просвет не изменен
Оценка состояния сперматогенеза (на основании данных De Kretser and Holstein)	
Балл	6
Гистологические данные: Зрелые сперматиды отсутствуют; отдельные круглые незрелые сперматиды	
Диагноз: Нарушение дифференцировки сперматид	
Дата выдачи заключения	
Врач	01.12.16 Игнатова Кристина Юрьевна



В структуре АО Медицинские технологии функционирует Клиника Семейной медицины

Высочайший и современный уровень
сперматологических исследований обеспечивается:

1. Наличием высококвалифицированного лабораторного работника Зубаревой Татьяны Михайловны, имеющего стаж выполнения сперматологических исследований более 20 лет.



2. Наличием анализатор качества спермы SCA компании Microptic Automatic Diagnostic system.

Автоматическая система анализа сперматозоидов, дающая быстрые и детализированные объективные результаты за пару минут (подвижность, концентрация, морфология и анализ фрагментации ДНК)



3. Использованием только рекомендуемых ВОЗ наборов реактивов для сперматологических исследований фирмы FertiPro



Перечень сперматологических исследований, выполняющихся лабораторией Клиники семейной медицины.

- 1. Спермограмма экспертного уровня на спермоанализаторе SCA**
- 2. Расширенная спермограмма для оценки возможности внутриматочной инсеминации после обработки сперматозоидов в градиентах плотности**
- 3. Цитоморфологическое исследование спермы**
- 4. Антиспермальные антитела в эякуляте IgG и IgA (MAR-test)**
- 5. Анализ фрагментации ДНК сперматозоидов (HALOSPERM)**
- 6. Исследование эякулята на оксидативную активность «ОКСИСПЕРМ»**
- 7. Тест на связывание сперматозоидов с гиалуроновой кислотой (определение морфофункциональной зрелости сперматозоидов)**
- 8. Посткоитальный тест (проба на совместимость цервикальной слизи со сперматозоидами)**
- 9. Микробиологическое исследование эякулята с использованием методики масс-спектрометрии**
- 10. Исследование ПЦР уретрального биоценоза АНДРОФЛОР**
- 11. Исследование эякулята на урогенитальные уреоплазмы и микоплазмы**

Спасибо за внимание!!!



**АО Медицинские технологии Клиника Семейной медицины
Екатеринбург ул. Бажова 68 тел (343) 270-17-17
Руководитель Панков Вячеслав Иванович +7-902-87-43-519**