

# ИНТЕГРАЛЬНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ — НОВЫЙ СПОСОБ ОЦЕНКИ ФЕРТИЛЬНОСТИ МУЖЧИН

УДК 612.6—055.1—07

Поступила 8.11.2010 г.



**С.Б. Артифексов**, д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии с курсом планирования семьи<sup>1</sup>;  
**М.Ю. Сергеев**, к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии с курсом планирования семьи<sup>1</sup>;  
**И.В. Бородачева**, к.м.н., старший преподаватель кафедры восстановительной медицины<sup>1</sup>;  
**М.С. Артифексова**, к.м.н., ассистент кафедры госпитальной педиатрии<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт ФСБ России, Н. Новгород;<sup>2</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

Репродуктивный потенциал мужчин оценивается по результатам спермограмм, получаемых на основании макро- и микроскопического исследования образца семенной жидкости. Такой подход не позволяет выявить интегральный показатель, эквивалентный нормальному репродуктивному потенциалу мужчины, поскольку показатели спермограмм по отдельности сопоставляются с процентными характеристиками нормы.

Авторами предложено производить подсчет только активно подвижных и морфологически сохраненных сперматозоидов после их предварительной сепарации методом всплытия и центрифугирования в градиенте концентрации. Это позволяет получить показатель абсолютного числа гамет в 1 мл эякулята. Порогом фертильности является наличие гамет, способных к оплодотворению (подвижные и морфологически сохраненные), в количестве 5 млн/мл. Снижение числа гамет ниже этого порога требует проведения уточняющих диагностических мероприятий и лечебных воздействий, тогда как его превышение свидетельствует о том, что мужчина потенциально фертилен.

**Ключевые слова:** сперматозоиды, эякулят, спермограмма, фертильность.

## English

### Integral index is a new way to assess men fertility

**S.B. Artifexov**, D.Med.Sc., Professor, the Department of Obstetrics and Gynecology with the Course of Family Planning<sup>1</sup>;  
**M.Y. Sergeev**, PhD, Associate Professor, the Department of Obstetrics and Gynecology with the Course of Family Planning<sup>1</sup>;  
**I.V. Borodacheva**, PhD, Senior Teacher, the Department of Rehabilitation Medicine<sup>1</sup>;  
**M.S. Artifexova**, PhD, Tutor, the Department of Hospital Pediatrics<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of the FSS of Russia, Nizhny Novgorod;<sup>2</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod

Reproductive potential of men is assessed according to spermatograms results obtained relying on macro- and microscopic investigation of sperm sample. This approach does not make it possible to have integral index that is equivalent to healthy reproductive potential of a man as spectrogram indexes are compared separately with percent characteristics of normal standards.

The authors suggest calculating only active mobile and morphologically saved sperm cells after their pre-separation using floating up and centrifugation method in concentration gradient. It enables to have the index of absolute gamete number in 1 ml of ejaculate. The fertility threshold is the presence of gametes able to be fertilized (mobile and morphologically saved), 5 mn/ml in number. If the number of gametes is lower than the threshold, other diagnostic tests and therapeutic modalities are required, while threshold elevation gives the evidence of man's potential fertility.

**Key words:** sperm cells, ejaculate, spermatogram, fertility.

Мужское бесплодие до сих пор остается актуальной проблемой [1—3].

В отличие от женских, мужские факторы бесплодия отмечаются в меньшем количестве и проще обнаруживаются. Однако в клинической практике эти факторы и их комбинации, снижающие фертильность у мужчин,

мало влияют на выбор лечебной тактики, и поэтому чаще всего остаются невыясненными. Отсутствие четких диагностических критериев приводит к тому, что мужская стерильность с невыясненной этиологией может достигать 25% [4, 5]. По другим данным, идиопатическими считаются от 30 до 75% случаев, что связы-

Для контактов: Артифексов Сергей Борисович, тел. моб. +7 905-661-78-81; e-mail: artifex54@mail.ru.

вают с недостаточностью сведений об этиопатогенезе нарушений мужской фертильности [6, 7].

В последние десятилетия во всем мире происходит ухудшение качества репродуктивного здоровья мужчин за счет снижения активности сперматозоидов. Обнаружение более низкой концентрации сперматозоидов в эякуляте у 15—25% здоровых мужчин, имеющих детей, явилось причиной изменения нормативных показателей спермы. Так, согласно исследованиям, проведенным в США, у мужчин за период 1930—1980 гг. средняя концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята снизилась более чем в 2 раза — со 140 до 60 млн, а в Европе за период 1938—1990 гг. этот же показатель уменьшился со 113 до 66 млн [1, 3, 8].

В процессе формирования инфертильности, обусловленной нарушениями гаметогенеза различной этиологии, происходит достоверное повышение эмбриональной смертности [2, 5, 7].

Явление снижения сперматогенной функции служит отражением возрастающего воздействия на организм человека повреждающих факторов, встречающихся в окружающей среде, на производстве и быту [3, 9, 10]. Сперматогенез представляет собой процесс непрерывного деления клеток, наиболее уязвимых для патогенного воздействия неблагоприятных внешних агентов [4, 6, 7]. Основные неблагоприятные факторы можно условно разделить на три группы: химические, физические и биологические [1, 2, 8]. Важными бытовыми факторами, оказывающими негативное влияние на активность сперматогенеза, являются употребление алкоголя, курение, наркомания [1, 3, 10]. Многие вредные факторы (профессиональные, природные и бытовые) по отдельности оказывают повреждающее влияние на сперматогенез лишь при достаточно высокой интенсивности воздействия, однако в сочетаниях и в случае длительной экспозиции могут вызывать выраженные нарушения и при достаточно низких значениях [5, 6, 9].

Для оценки фертильности в настоящее время широко используется общепринятая методика анализа эякулята [11]. Она включает в себя: а) первоначальную макроскопическую оценку эякулята (разжижение, вид, объем, вязкость, определение pH); б) первый этап микроскопического исследования эякулята (предварительная оценка концентрации сперматозоидов, оценка их подвижности, изучение клеточных элементов эякулята (кроме сперматозоидов); в) второй этап микроскопического исследования эякулята, в ходе которого выполняются следующие процессы.

1. Окрашивание препарата для оценки жизнеспособности сперматозоидов. Под жизнеспособностью подразумевают долю (в процентах) «живых» сперматозоидов, которые определяют по исключению красителя или гипосмотическому набуханию. Жизнеспособность оценивают, если количество неподвижных сперматозоидов превышает 50%. Пропорцию живых и мертвых сперматозоидов определяют с использованием методов окрашивания препарата, основанных на принципе поглощения мертвыми клетками с поврежденными плазматическими мембранами определенных красителей. С помощью светового или фазово-конт-

растного микроскопа производят подсчет 200 сперматозоидов, дифференцируя живые (неокрашенные) и мертвые (окрашенные) сперматозоиды.

Оценка жизнеспособности служит контролем точности оценки подвижности сперматозоидов, поскольку процент мертвых клеток не должен превышать (с учетом ошибки подсчета) процент неподвижных сперматозоидов. Наличие большого количества живых, но неподвижных сперматозоидов может указывать на структурные дефекты жгутиков.

2. Определение концентрации сперматозоидов. Концентрацию оценивают с помощью гемоцитометра в двух разных образцах одного эякулята, по одному на каждую сторону счетной камеры. Степень разведения определяют во время предварительной оценки концентрации сперматозоидов. Для разведения применяют раствор, приготовленный путем добавления в дистиллированную воду 50 г бикарбоната соды, 10 мл 35% раствора формалина и либо 0,25 г трипанового синего, либо 5 мл насыщенного водного раствора генциан-виолета. Конечный объем раствора доводят до 1 л. При работе с фазово-контрастным микроскопом краситель не добавляют.

Лейкоцитарные и автоматические пипетки, действие которых основано на принципе замещения воздуха, недостаточно точны, чтобы производить ими объемные разведения эякулята. Для этих целей следует использовать пипетки, работающие по принципу положительного замещения.

3. Оценка морфологии сперматозоидов. С этой целью готовят два мазка из образца свежего эякулята. На поверхность чистого, обезжиренного, сухого стекла наносят небольшую каплю эякулята, высушивают и фиксируют. Производят исследование морфологии эякулята. При морфологической оценке рассматривают функциональные участки сперматозоида, преобладающие дефекты (головки, шейки и средней части, хвоста).

Таким образом, данная методика дает характеристику спермограммы по разным параметрам. Показатели спермограмм по отдельности сопоставляются с процентными характеристиками нормы для каждого пациента. Однако этот подход не позволяет получить интегральный показатель, эквивалентный нормальному репродуктивному потенциалу мужчины.

Нами предложена новая технология оценки фертильности мужчин по интегральному показателю, представляющему собой абсолютное количество активно подвижных и морфологически сохраненных сперматозоидов, которых не должно быть менее 5 млн/мл. При этом определяются активно подвижные и морфологически сохраненные сперматозоиды после их предварительной сепарации методом всплытия и центрифугирования в градиенте концентрации [12]. Данная методика заключается в следующем.

#### *1. Определение концентрации.*

1. Выделяют подвижные клетки сперматозоидов с помощью лабораторного препарата «Фертикалт Флашинг Медиум» (ф. «Ферти-Про», Бельгия) — далее ФФМ, который производится согласно условиям Good

Manufacturing Practice. ФФМ не содержит в себе гепарин. Для забора ооцитов добавляют гепарин или используют препарат «Фертикалт Аспирэйшн Медиум». Также как все культуральные среды, реагент ФФМ следует предварительно выдержать в инкубаторе в течение 24 ч перед использованием. ФФМ стерилизован путем стерильной фильтрации, он может храниться при температуре от 15 до 25°C. Тестирован на культуре клеток.

Качество HSA (альбумин сыворотки человека) соответствует фармакопейным продуктам, он полностью тестирован на антигены HbsAG, HIV 1/2, HCV.

2. Промывку сперматозоидов производят при комнатной температуре. Нативный образец центрифугируют в течение 15 мин при 300 g. Удаляют супернатант и оставляют около 0,5 мл непромытой спермы в пробирке. Добавляют 3 мл ФФМ. Медленно перемешивают до придания смеси однородного состояния. Центрифугируют 15 мин при 300 g.

3. Для выделения из эякулята нормальных и подвижных сперматозоидов используют набор «Сил-Селект» (ф. «Ферти-Про», Бельгия) — набор растворов с градиентом концентрации для подготовки спермы. С этой целью помещают 2,5 мл раствора «Сил-Селект Плюс» верхнего слоя в стерильную центрифужную пробирку. Используя 3 мл шприц с иглой, под верхний слой вносят 2,5 мл раствора «Сил-Селект Плюс» нижнего слоя. Это достигается путем помещения кончика иглы на дно пробирки и медленного выдавливания из шприца нижнего слоя.

Далее на верхний слой аккуратно помещают 2,5 мл жидкой спермы, используя микропипетку (шприц), центрифугируют от 15 до 18 мин при 350—400 g. Удаляют супернатант до осадка. Используя шприц, добавляют 2—3 мл среды для промывки спермы («Флашинг Медиум») и ресуспендируют осадок. Центрифугируют 8—10 мин при 300 g. Удаляют супернатант до осадка и помещают подвижные сперматозоиды в необходимый объем соответствующей среды.

**II. Определение морфологически сохраненных сперматозоидов.**

После проведенной сепарации методом всплытия и центрифугирования в градиенте концентрации подсчитывают активные подвижные морфологически сохраненные сперматозоиды. Это позволяет получить показатель абсолютного числа гамет в 1 мл эякулята.

Порогом фертильности является наличие гамет, способных к оплодотворению (подвижные и морфологически сохраненные), в количестве не менее 5 млн/мл. Снижение числа гамет ниже этого порога требует проведения уточняющих диагностических мероприятий и лечебных воздействий, тогда как его превышение свидетельствует о том, что мужчина потенциально фертилен, и не требует дальнейших диагностических и лечебных процедур.

Интегральный показатель необходим для объективной оценки репродуктивного потенциала мужчины, он позволяет не только оценивать исходное качество гамет, но и определять алгоритм восстановления фертильности в партнерской паре. По сравнению с общепринятой методикой анализа эякулята в предлагаемом нами способе вместо множественных характеристик спермы, оценивающихся в относительных величинах, вычисляется один абсолютный показатель — концентрация сперматозоидов с сохраненными морфофункциональными характеристиками.

С использованием интегрального показателя и общепринятой методики было обследовано 85 мужчин на базе Нижегородского областного клиничко-диагностического центра.

Установлено, что в тех случаях, когда количество функционально активных сперматозоидов составляло  $5,3 \pm 0,3$  млн/мл (1-я группа, 56 мужчин, 65,8%), беременность у половых партнерш фиксировалась во всех случаях наблюдения. В тех случаях, когда количество функционально активных сперматозоидов составляло менее 5 млн/мл (2-я группа, 29 мужчин, 34,2%), беременность у половых партнерш не наступала. По стандартной методике исследования эякулята как в 1-й, так и во 2-й группе сводились к оценке изменений подвижности, морфологии, жизнеспособности и не имели достоверных различий (см. таблицу).

*Приводим пример. Пациент В., 34 года, из бесплодной супружеской пары. При анализе эякулята по общепринятой методике получены следующие данные: сперматозоидов — 50 млн/мл (10% — активных, 10% — морфологически нормальных). Заключение: «Астенотератозооспермия. Пациент инфертилен».*

*При оценке предлагаемым нами способом получены следующие данные: 10% от 50 млн (общее количество сперматозоидов) — 5 млн/мл подвижных активных спер-*

**Отклоняющиеся от нормы показатели спермограммы в исследуемых группах при оценке эякулята по общепринятой методике ( $M \pm m$ )**

	1-я группа		2-я группа	
	Количество мужчин	Число отклонений, %	Количество мужчин	Число отклонений, %
Снижение подвижности	11	19,64±5,31	7	24,14±8,08
Изменения морфологии	21	37,50±6,47	9	31,03±8,74
Снижение жизнеспособности	10	17,86±5,12	4	13,80±6,51
Сочетание двух и более факторов	14	25,00±5,79	9	31,03±8,74

матозоидов; 10% от 50 млн — 5 млн/мл морфологически сохраненных сперматозоидов. Заключение: «Репродуктивный потенциал сохранен. Пациент фертилен».

После дообследования супруги был установлен диагноз: «эндокринное бесплодие (гипотиреоз)», фармакологическая коррекция которого завершилась беременностью.

Таким образом, оценка эякулята по общепринятой методике носила лишь ориентировочный характер, тогда как определение активно подвижных и морфологически сохраненных сперматозоидов позволило сделать прогноз и в дальнейшем эффективно проводить консервативную терапию по повышению фертильности мужчины.

### Литература

1. *Артифексов С.Б., Рыжаков Д.И.* Диагностика и лечение заболеваний половой сферы у мужчин. Н. Новгород: Из-во НГМА; 2003; 236 с.
2. *Рыжаков Д.И., Артифексов С.Б.* Мужское бесплодие и сексуальные дисфункции. Н. Новгород: Из-во НГМА; 2002; 308 с.
3. *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction.* E. Nieschlag, H.M. Behre (editors). Springer; 2000; 440 p.
4. *Абубакиров А.Н.* Повреждения ДНК сперматозоидов и мужское бесплодие. Урология 2009; 3: 86—91.
5. *Байкошкарлова С.Б., Рудь С.Е., Отарбаев М.К. и др.* О вариабельности эякулята. Проблемы репродукции 2009; 4: 59—61.
6. *Божедомов В.А., Громенко Д.С., Ушакова И.В. и др.* Оксидативный стресс сперматозоидов в патогенезе мужского бесплодия. Урология 2009; 2: 51—56.
7. *Gleicher N., Barad D.* Unexplained infertility: does really exist? Hum Reprod 2006; 21(8): 1951—1955.
8. *Чалый М.* Репродуктивная функция мужчин в XXI веке. Врач 2009; 6: 6—7.
9. *Егорова А.М.* Параметры репродуктивной функции у рабочих, занятых в черной металлургии. Урология 2009; 2: 65—68.
10. *Хохряков А.В.* Морфо-функциональная характеристика мужской репродуктивной системы при острой и хронической алкогольной интоксикации. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Н. Новгород; 2009.
11. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 5th ed. World Health Organization; 2010; 271 с.
12. *Артифексов С.Б., Сергеев М.Ю., Седышева И.В.* Способ оценки фертильности мужчины. Патент 2360247 РФ, МПК А 61 В5/00. Заявл. 25.06.2007. Опубл. 27.06.2009.