

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

© САПОЖКОВА Ж.Ю., ЕРЕМИН К.И., 2020

Сапожкова Ж.Ю.^{1,2}, Еремин К.И.¹

МОДИФИКАЦИЯ ПРОТОКОЛА АНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА СПЕРМОГРАММЫ

¹Международная школа цитологии, 111674, Москва, 196641, Санкт-Петербург, Россия;

²Подольский диагностический центр, 142117, Подольск, Московская область, Россия

Лабораторное руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека (5-е издание, 2010 г.) содержит стандартизированные, основанные на фактических данных процедуры, которым рекомендовано следовать при выполнении анализа. Несмотря на это, существуют некоторые разночтения в толковании этого документа. В России протокол ВОЗ по определению концентрации пероксидазо-позитивных клеток и сперматозоидов, а также оценке их жизнеспособности и морфологии не полностью соответствует протоколам других стран. Большинство российских руководств по анализу спермы человека содержит не актуальную информацию из 4-ого издания ВОЗ от 1999г. Сложившаяся ситуация привела к отсутствию единого подхода к аналитическому этапу спермограммы. В целях стандартизации, разработан набор реагентов (ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА, ООО «ГЕМСТАНДАРТ», С.-Петербург, Россия), позволяющий структурировать протокол исследования, получить необходимую точность и полноту анализа в оценке фертильности мужчин. Такой подход представляется крайне важным для надлежащей клинико-лабораторной оценки в целях сохранения здоровья как мужчины, так и семьи в целом.

Ключевые слова: анализ спермы человека; спермограмма; пероксидазо-положительные клетки; концентрация сперматозоидов; подвижность сперматозоидов; жизнеспособность сперматозоидов; нормальная и аномальная морфология сперматозоидов.

Для цитирования: Сапожкова Ж.Ю., Еремин К.И. Модификация протокола аналитического этапа спермограммы. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (2): 106-110. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-106-110>
Sapozhkova Zh.Yu.,^{1,2}, Eremin K.I.¹

UPDATES IN PROTOCOL FOR HUMAN SEMEN EXAMINATION

¹International Cytology School, Moscow, Saint Petersburg, Russia;

²Centre of Laboratory Diagnostics in Podolsk, Russia

Currently, the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (5th edition, 2010) provides updated, standardized, evidence-based procedures and recommendations for laboratory managers, scientists and technicians to follow in examining human semen in a clinical or research setting. Despite the fact, there are several gaps and limitations in the interpretation of this compendium. Mostly, the WHO-protocol of estimation of peroxidase-positive cells and spermatozoa, as well as evaluation of their viability and morphology are not so affordable and applicable in Russia due to peculiarities of laboratory market. Furthermore, most of Russian manuscripts do not reflect a unified approach to the analytical stage of semen analyses. In order to standardize the protocol for human semen examination which adopted to Russian lab it was developed packing of reagents (GEMSTANDART-SEMEN ANALYSES, LLC 'GEMSTANDART', Saint Petersburg, Russia) allowing to obtain an accuracy and completeness of the examination. In summary, this approach is a necessary step in male fertility evaluation. Together with a clinical information, it is indispensable for planning the appropriate clinical management and tacking care in male health.

Key words: semen analysis; peroxidase-positive cells; sperm concentration; sperm motility; sperm vitality; normal and abnormal sperm morphology.

For citation: Sapozhkova Zh.Yu., Eremin K.I. Updates in protocol for human semen examination. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (2): 106-110. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-106-110>

For correspondence: Sapozhkova Zh.Yu., MD, PhD, Master, Head of the International Cytology School, Head of Clinical Lab; e-mail: jannet72@mail.ru

Information about author:

Sapozhkova Zh.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-3068-2260>

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 19.12.2019
Accepted 20.12.2019

В настоящее время руководство ВОЗ (5-е издание, 2010 г.) регламентирует исследование и обработку эякулята человека для установления фертильности и мониторинга сперматогенеза мужчины [3,14]. Несмотря на то, что этот документ содержит отличные от прежних значений референсные диапазоны [15-17], существуют определенные сложности и ограничения в использовании его в России. В руководстве ВОЗ рекомендуется применение ряда реагентов и приборов, не зарегистрированных в России и содержащих канцерогенные прекурсоры. Сегодня нет единого подхода к аналитическому лабораторному этапу исследования спермограммы, как следствие - разночтение результатов, неверная диагностика и лечение. Концентрация истинных лейкоцитов/пероксидазо-положительных клеток (ППК), сперматозоидов, а также оценка их жизнеспособности и морфологии, ошибочное определение которых не допустимо, остаются одними из проблемных параметров анализа эякулята. Предлагается стандартизация протокола спермограммы, который заложен в наборе реагентов «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (Санкт-Петербург, Россия).

Материал и методы. За период с мая по ноябрь 2019 г. на учебной базе Международной Школы Цитологии (Москва) проведен корреляционный анализ результатов клинического анализа спермы от 200 мужчин 29-65 лет. Исследования выполнены в клинико-диагностической лаборатории сети медицинских клиник г. Подольска двумя способами.

Способ 1. Используются растворы, приготовленные согласно прописям рекомендаций и протоколов по анализу спермы человека, представленных в широком доступе в интернете [1-4,7,10-17]. Прописи содержат вещества, обладающие канцерогенным, мутагенным действием (насыщенный раствор формальдегида, ортолуидин).

Способ 2. Используется набор реагентов «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (далее Набор) для комплексной оценки показателей спермограммы. Инновационная составляющая Набора – комбинированный подход к измерению концентрации ППК и сперматозоидов в эякуляте человека на основе цитохимического окрашивания. В состав набора входят следующие компоненты: Реагент №1 - проявитель: смесь натрия фосфорнокислого двузамещенного, калия фосфорнокислого однозамещенного, аммония хлористого, динатриевой соли этилендиаминотетрауксусной кислоты и бензидина; Реагент №2 - перекись водорода 30 %; Реагент №3 - раствор эозина, 5 % водный; Реагент №4 - раствор нигрозина, 10 % водный; Реагент №5 - краситель азур-эозин по Романовскому; Реагент №6 - фиксатор-краситель эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду; Реагент №7 - фосфатно-солевой раствор бромелайна. Набор не содержит тканей, клеток и биологических веществ человеческого или животного происхождения; в нем нет веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным или влияющим на репродуктивную деятельность человека действием.

Принцип действия и назначение Набора реагентов в способе 2.

Реагенты №1 и Реагенты №2, входящие в состав Набора, при обработке образца спермы окрашивают в коричневый цвет клетки, содержащие пероксидазу (нейтрофильные лейкоциты). Клетки, не содержащие пероксидазу (сперматозоиды, клетки сперматогенеза, лимфо-

циты, моноциты, макрофаги, спермиофаги, гистиоциты, эритроциты, липоидные тельца, эпителий), остаются бесцветными. В качестве положительного контроля при определении окраски ППК образцов эякулята используется цельная кровь, результаты окраски оценивают микроскопией.

Реагент №2 Набора позволяет использовать рабочий раствор реагента при разведении спермы 1:10 как для подсчета концентрации ППК, так и фиксировать подвижные клетки для последующего подсчета концентрации сперматозоидов в больших квадратах камеры Горяева, используя соответствующие формулы. Определение двух важнейших параметров спермограммы (концентрация ППК и сперматозоидов) в одной пробирке важно для оптимизации производственного процесса, сокращения времени оборота теста в лаборатории (TAT - turn around time). Подсчет концентрации круглых клеток (КК) не проводится, необходима только предварительная качественная оценка наличия КК в препарате.

Реагент №3 и Реагент №4 предназначены для определения процентного соотношения живых и мертвых сперматозоидов. В результате взаимодействия 10 мкл спермы с 20 мкл Реагента №3 в течение 5 с и 30 мкл Реагента №4 в течение последующих 5 с на предметном стекле, отчетливо визуализируются окрашенные эозином в красный цвет мертвые сперматозоиды и неокрашенные (бесцветные) живые сперматозоиды. Строгое соблюдение указанных дозировок в аликвотировании эякулята и реагентов позволяет произвести качественное окрашивание, безошибочно идентифицировать и определить процентное соотношение живых и мертвых сперматозоидов.

Реагент №5 и Реагент №6 идентифицируют внутриклеточные субстанции эякулята. Принцип действия основан на том, что они имеют разную pH и связываются с красителем с противоположной реакцией. Ацидофильные структуры окрашиваются в разные тона красного цвета, базофильные структуры – в тона от пурпурового до синего. Ядра клеток богаты нуклеиновыми кислотами, имеют кислую реакцию и окрашиваются азур-эозином в сине-фиолетовый цвет. Головки сперматозоидов окрашиваются в синий цвет с сиреневой или фиолетовой акросомальной частью. Хвосты сперматозоидов окрашиваются в нежно-сиреневый цвет. Цитоплазматическая капля и шейка сперматозоида окрашиваются в сине-фиолетовый цвет.

Реагент №7 используется для разжижения вязкого эякулята. Он представляет собой раствор бромелайна на фосфатном буфере Дульбеко, разжижает эякулят в короткий срок (до 10 мин в термостате при температуре 37°C 10 минут).

Приготовление рабочего раствора из реагентов 1 – 2. К флакону с Реагентом №1 осторожно добавить 10 мкл Реагента №2 и перемешать. Рабочий раствор использовать в течение 24 часов при хранении при 0-5°C. Остатки неизрасходованного рабочего раствора аликвотировать по 500 мкл в сухие микропробирки типа Эппендорф и заморозить. Допускается 1 месяц хранения в морозильной камере с последующим однократным размораживанием перед проведением исследования. Реагенты №3–7 готовы к использованию.

Проведение анализа. Если разжижение эякулята не наступает в течение 60 минут, в пробирку со всей порцией эякулята вносят пипеткой Пастера равное количество Реагента №7 в соотношении 1+1 (1:2), размешивают, не

допуская образования пузырьков, инкубируют пробирку в термостате при температуре 37°C 10 минут. Процедура разжижения влияет на биохимические показатели эякулята, подвижность и морфологию сперматозоидов, поэтому использование процедуры указывается дополнительно в протоколе исследования. Разведение 1+1 (1:2) следует учитывать при расчете концентрации сперматозоидов и лейкоцитов.

Окрашивание и подсчет ППК в эякуляте

1. Тщательно перемешать образец спермы, не допуская образования пузырьков и пены.

2. В пробирку поместить аликвоту из 20 мкл спермы и 180 мкл рабочего раствора (разведение 1:10) – готовая смесь исследуемого препарата.

3. Аккуратно перемешать суспензию в течение 10 сек стеклянной палочкой и инкубировать при 37°C 30 минут.

4. После предварительного аккуратного повторного перемешивания суспензии заполнить две стороны камеры Горяева.

5. Для осаждения клеток, удерживать камеру Горяева горизонтально не менее 4 минут при комнатной температуре.

6. Оценить заполненные камеры в световом микроскопе при увеличении $\times 200$ или $\times 400$.

7. Подсчитать число ППК в больших квадратах камеры Горяева с помощью лабораторного счетчика. Рекомендуется считать 2-3 раза с последующим определением среднего значения ППК.

Расчет концентрации ППК проводить согласно двум вариантам в зависимости от результатов предварительной визуальной оценки КК.

Подсчет концентрации лейкоцитов/ППК. Если КК располагаются в монослоях (не большое/малое количество при визуальной оценке микроскопией), ППК считать в 100 больших квадратах камеры Горяева, разделенных на 4 малых.

Расчет проводить по формуле 1:

$$L = (a \times 250 \times 10) / (100 \times 1000) \text{ [млн/мл]} \text{ (формула 1)},$$

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

Сокращенный вариант формулы 1:

$$L = a / 40 \text{ [млн/мл]}.$$

Если КК располагаются в мультислоях (большое количество после предварительной визуальной оценки), считать ППК в 40 больших квадратах (20 квадратов сверху сетки и 20 – внизу).

Расчет проводить по формуле 2:

$$L = (a \times 250 \times 10 \times 1000) / (40 \times 1000000) \text{ [млн/мл]} \text{ (формула 2)},$$

где a – ППК в 40 больших квадратах, 250 - $1/250$ - объем одного большого квадрата, 10 – степень разведения спермы, 1000 - пересчет из 1 мкл в 1 мл эякулята, 40 – количество больших квадратов.

Сокращенный вариант формулы 2:

$$L = a \times 0,0625 \text{ [млн/мл]}.$$

Подсчет концентрации сперматозоидов. Если сперматозоиды лежат в монослоях (малое количество после предварительной визуальной оценки), то разводить эякулят следует в соотношении 1:10.

Определение концентрации сперматозоидов проводить в 5 больших квадратах камеры Горяева, разделенных на 16 малых, по диагонали.

Расчет проводить по формуле 3:

$$C = a \times 500 \text{ 000 [млн/мл]} \text{ (формула 3)},$$

где C – концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята, a – количество сперматозоидов в 5 больших квадратах по диагонали.

Если сперматозоиды лежат в мультислоях (большое количество после предварительной визуальной оценки), то увеличить разведение до 1:20 и более путем добавления в пробирку №1 еще 200 мкл рабочего раствора. В случае, если требуется разведение 1:40, 1:80, то добавить в пробирку №1 с существующим разведением каждый раз по 200 мкл рабочего раствора, соответственно. После предварительного аккуратного повторного перемешивания суспензии заполнить камеру Горяева. При расчете в формулу 3 внести коэффициент, соответствующий дополнительному разведению эякулята.

Для осаждения клеток удерживать камеру Горяева горизонтально не менее 4 минут при комнатной температуре. Оценить заполненную камеру в свето-оптическом микроскопе при увеличении $\times 200$ или $\times 400$. Подсчитать число сперматозоидов с помощью лабораторного счетчика.

Процедура анализа эякулята. В Способе 1 процедура анализа эякулята состояла из трех этапов: 1) определение концентрации сперматозоидов; 2) окрашивание и определение доли живых/мертвых сперматозоидов; 3) окрашивание в целях дифференцировки морфологии сперматозоидов и определения доли нормальных и патологических форм. Этап окрашивания и определения концентрации ППК был заменен на определение концентрации нейтрофильных гранулоцитов путем субъективной их оценки («на глаз») по косвенным идентификационным признакам. Разжижения вязкого эякулята не проводили: образцы либо отбраковывали с пометкой «оценка концентрации и общего количества сперматозоидов невозможна ввиду высокой вязкости биоматериала, исследование повторить», либо происходило неполноценное аликвотирование 20 мкл вязкого эякулята с потерей объема последнего.

В Способе 2 процедура анализа эякулята состояла из четырех или пяти этапов (в зависимости от вязкости эякулята): 1) разжижение вязкого эякулята, если вязкость превышала пороговое значение ≥ 20 мм; 2) окрашивание и определение концентрации ППК; 3) определение концентрации сперматозоидов; 4) окрашивание и определение доли живых/мертвых сперматозоидов; 5) окрашивание в целях дифференцировки морфологии сперматозоидов и определение доли нормальных и патологических форм.

Результаты и обсуждение. Способом 1 и Способом 2 параллельно было исследовано 200 образцов эякулята по четырем важным диагностическим параметрам: концентрация лейкоцитов и сперматозоидов, жизнеспособность эякулята и морфология сперматозоидов. Оценивалось количество образцов, в которых показатели не соответствовали референсным значениям, указанным в 5-м руководстве ВОЗ (см.таблицу).

Результаты таблицы свидетельствуют, что при оценке свойств эякулята Способом 1 из 200 исследованных образцов в 136 (68 %) выявлены отклонения, выходящие за референтные значения; в Способе 2 патологические отклонения выявлены в 37 % тех же образцах эякулята. Как видно из таблицы, высокий процент выявленных отклонений Способом 1 – это преимущественно олиоспермия. Согласно данным литературы [5,6,8,9], умеренные уровни ППК в эякуляте (< 1 млн/ мл) являются физиологической нормой; при более высоких концентрациях (от 1-2,5 млн/мл) сперма может оставаться фертильной.

Сравнительные результаты выявления показателей эякулята использованными способами, выходящие за референсные значения, указанные в 5-м руководстве ВОЗ

Выявленная патология (анализировано 200 образцов эякулята)	Способ 1, результат	Способ 2, результат
Пиоспермия (концентрация ППК (лейкоцитов) > 1 млн/мл)	96	55
Некрозооспермия (количество живых сперматозоидов < 58%)	21	10
Олигозооспермия (концентрация сперматозоидов < 15 млн/мл)	11	5
Тератозооспермия (количество патологических форм >4%)	8	4
Всего категория патологии, n	136	74

Необходимо обращать внимание на критично высокий уровень ППК (>2,5 млн/мл), частота наступления беременности при котором уже может снижаться. В этой связи, урологу-андрологу крайне важно иметь это в виду, а специалисту КДЛ не допускать ложную пиоспермию, так как необоснованно назначенное антибактериальное лечение может необратимо спровоцировать патологию остальных главных показателей эякулята.

Главным источником расхождений было отсутствие в Способе 1 обработки спермы реагентами для цитохимического окрашивания нейтрофильных гранулоцитов, которые окрашивают круглые клетки (КК), содержащие пероксидазу, в коричневый цвет. За основу подсчета лейкоцитов Способом 1 была принята известная методика количественной оценки содержания КК (концентрации) без цитохимического окрашивания ППК (нейтрофильных лейкоцитов) в эякуляте [1]. Недостатки методики следующие: 1) производится оценка и определение концентрации всех КК, а не только нейтрофильных гранулоцитов/ППК; 2) применяются косвенные идентификационные признаки ППК путем субъективной оценки (округлая форма, сегментированные ядра, микроворсинчатая поверхность, средний размер), что не соответствует рекомендациям ВОЗ. Очевидно, что методика не приемлема для мониторинга содержания лейкоцитов в сперме, так как не дает представления об истинном содержании ППК. Как результат, происходила ошибочная интерпретация и излишний подсчет концентрации бесцветных (неокрашенных) лейкоцитов: за ППК были приняты все КК, не содержащие пероксидазу, наряду с истинными лейкоцитами, содержащими пероксидазу. Все эти клетки были отнесены к лейкоцитам по их субъективным признакам, что привело к ложной пиоспермии.

Согласно Руководству ВОЗ, 5-е издание, оценку и вычисление концентрации лейкоцитов в эякуляте осуществляют с помощью метода цитохимического окрашивания токсичным, канцерогенным и мутагенным раствором на основе орто-толуидина [3, 14]. Использование этого протокола в России затруднено, так как: 1) отсутствует коммерчески доступный набор для окрашивания; составить набор из 6 реагентов затруднительно, так как орто-толуидин является прекурсором и в свободном доступе отсутствует; 2) в медицинских лабораториях запрещено использование самостоятельно приготовленных реагентов, к тому же современные лаборатории не имеют необходимого поверенного оборудования: весов, оборудования для титрования; в КДЛ России используют готовые наборы реагентов; 3) результаты считают в усовершенствованном гемоцитометре Нейбауэра, который отсутствует на российском лабораторном рынке оборудования с регистрационным удостоверением; 4) формула подсчета адаптирована к гемоцитометру Нейбауэра, что вызывает определенные трудности.

В соответствии с различными вариациями протоколов спермограммы [1-4, 7, 10-17], широкое применение в практике КДЛ нашла еще одна методика оценки и вычисления концентрации ППК в эякуляте. При ее осуществлении используют полуколичественную оценку содержания лейкоцитов в эякуляте на тест-полоске с помощью иммунохроматографического метода (без цитохимического окрашивания), основанного на ферментативной активности лейкоцитарной эстеразы [2]. Недостатки методики заключаются в следующем: 1) позволяет осуществить только приблизительное определение концентрации лейкоцитов в эякуляте (полуколичественный метод определения – метод сухой химии на тест-полоске (> или <1x10⁶); 2) методика основана на цветовой индикации в зоне тест-полоски, что может приводить к ложной пиоспермии, так как лейкоцитарная эстераза появляется в биожидкости также и при разрушении лейкоцитов; 3) методика не дает истинного представления о наличии или отсутствии воспалительного процесса у мужчины.

Основная причина расхождения одиннадцати (11) результатов в определении некрозооспермии Способами 1 и 2 (Таблица 1) - это отсутствие точного дозирования при аликвотировании компонентов при суправитальной окраске по Блему для дальнейшего цитохимического окрашивания сперматозоидов.

Необходимо подчеркнуть, что все результаты, указывающие на некрозооспермию Способом 2, входили в число случаев некрозооспермии Способом 1. Методика Способа 1 регламентирует окрашивание в течение 30 с на предметном стекле 1-й капли эякулята и равного количества 5% водного эозина. В результате, живые сперматозоиды должны оставаться бесцветными, а мертвые - окрашиваться в красный цвет [2]. Неточное дозирование компонентов и несоблюдение времени окрашивания может приводить к переокрашиванию сперматозоидов.

Существует методика оценки живых и мертвых сперматозоидов, описанная Е.Е. Брагиной [1], где рекомендовано окрашивание смеси 1 капли неразведенного перемешанного эякулята с 1 каплей красящего раствора из 5% водного эозина и 10% нигрозина в течении 30 секунд. Основной недостаток такого подхода – также отсутствие точного дозирования при аликвотировании компонентов. Как результат - переокрашивание сперматозоидов и ложная некрозооспермия.

В отличие от вышеупомянутых методик дифференцировки жизнеспособности эякулята, протокол окрашивания Набора (Способ 2) определяет строгое соблюдение дозирования аликвот, в результате достигается надлежащее качество окраски как фона препарата, так мертвых и живых сперматозоидов.

Причина расхождения результатов установленной олигозооспермии в шести (6) пробах (см.таблицу) рассматривается в отсутствии этапа разжижения вязкого эякуля-

та необходимым для этой процедуры реагентом. Как результат, неполноценное аликвотирование 20 мкл вязкого эякулята в узкую часть наконечника дозатора. В итоге, потеря объема спермы во время дозирования приводила к потере концентрации сперматозоидов.

Возможная причина четырех (4) расхождений в Способах 1 и 2 при оценке нормальных и патологических форм сперматозоидов (см. таблицу) - применение методикой быстрого окрашивания эякулята Diff-Quik, рекомендованной ВОЗ [3, 14]. С одной стороны, применение экспресс-окрашивания снижает ТАТ, что оптимизирует производственный процесс. С другой стороны, получаются препараты более низкого качества по сравнению с мазками, окрашенными традиционным методом по Романовскому, что предлагает Набор. Отмечается, что анализ морфологии сперматозоидов достаточно субъективен и трудно поддается стандартизации [3, 14] даже при окраске традиционным методом. Констатируем, что использование Реагента № 5 и Реагента № 6 Набора повышает качество окрашивания, что дает возможность улучшить должную оценку эякулята.

Заключение. Ошибочное определение главных параметров анализа спермы человека, таких как концентрация ППК, сперматозоидов, а также определение их жизнеспособности и морфологии, крайне недопустимы для понимания истинной фертильности мужчины. Технологические возможности предлагаемых реагентов для комплексного исследования спермы человека, позволяют исключить ошибки аналитического этапа спермограммы. Подтверждена идентичность полученных результатов окрашивания с помощью Набора реагентов «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (ООО «ГЕМСТАНДАРТ», С.-Петербург, Россия) аналогичным по составу прописям реагентов, рекомендованным ВОЗ для исследования эякулята (Руководство ВОЗ по исследованию и обработке спермы человека, 5-я редакция (2010 г.) и другим российским рекомендациям. Внедрение в практику КДЛ Набора, наряду с профильным повышением квалификации специалистов, – это шаг на пути к стандартизации протокола спермограммы и дальнейшей правильной диагностике и лечению мужчин с бесплодием.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5-17 см. REFERENCES)

1. Брагина Е.Е. Протокол проведения спермиологического исследования. *Андрология и генитальная хирургия*. 2014; 1: 24.
2. Долгов В.В., С.А. Луговская, Н.Д. Фанченко, И.И. Миронова, Е.К. Назарова, Н.Г. Ракова и др. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. М.-Тверь: Триада; 2006.
3. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. 5-е изд. М.: Капитал-Принт; 2012.
4. Шадохина И.С., Кузнецова В.С. Исследование эякулята. Учебное пособие. М.: МОНИКИ; 2014.

REFERENCES

1. Bragina E.E. Semen analyses protocol [Protocol provedeniya spermiologicheskogo issledovaniya]. *Andrologiya i genital'naya khyrurgiya*. 2014; 1: 24. (in Russian)
2. Dolgov V.V., Lugovskaya S.A., Fanchenko N.D., Mironova I.I., Nazarova E.K., Rakova N.G. et al. Laboratory diagnostics of male infertility [Laboratornaya diagnostika muzhskogo besplodiya]. Moscow-Tver': «Triada»; 2006. (in Russian)
3. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. WHO [Rukovodstvo po issledovaniyu i obrabotke eyakulyata cheloveka]. Moscow: Capital Print; 2012. (in Russian)
4. Shatokhina I.S., Kuznetsova V.S. Semen analyses manual WHO [Uchebnoe posobie po issledovaniyu eyakulyata]. Moscow: MONIKI; 2014. (in Russian)
5. Aitken R.J., Baker H.W. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Hum. Reprod.* 1995;10:1736–9.
6. Aitken R.J., West K., Buckingham D. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. *J. Androl.* 1994;15:343–52.
7. Cao X.-W., Lin K., Li C.-Y., Yuan C.-W. A review of WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Zhonghua nan ke xue - National journal of andrology*. 2011;17(12):1059–63.
8. Esfandiari N., Sharma R.K., Saleh R.A., Thomas A.J., Jr. Agarwal A. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. *J. Androl.* 2003;24: 862–70.
9. Virginie Barraud-Lange, Jean-Christophe Pont, Ahmed Ziyat, Khaled Pocate, Christophe Sifer, Isabelle Cedrin-Durnerin, Bouchra Fechtali, Beatrice Ducot, and Jean Philippe Wolf. Seminal leukocytes are Good Samaritans for spermatozoa. *J. Androl. Fertil Steril*® 2011; 96:1315–9. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.
10. Kvist U., Björndahl L. Manual on Basic Semen Analysis. Oxford: Oxford University Press; 2002.
11. Masha Ahadi, Fereshte Aliakbari et al. Evaluation of the Standardization in Semen Analysis Performance According to the WHO Protocols Among Laboratories in Tehran, Iran. 2019; Spring; https://www.researchgate.net/journal/17355303_Iranian_Journal_of_Pathology 14(02): 142–7. Published online 2019 Jun 10. doi: 10.30699/IJP.14.2.142 PMID: PMC6679670.
12. Menkveld R. The basic semen analysis. In: Oehringer S, Kruger TF, editors. *Male Infertility*. Ch. 9. Oxford: Informa Healthcare, UK; 2007:141–70.
13. Suresh C. Sikka, Wayne J.G. Hellstrom. Current updates on laboratory techniques for the diagnosis of male reproductive failure. *Asian J. Androl.* 2016 May-Jun; 18(3): 392–401. Published online 2016 Apr 8. doi: 10.4103/1008-682X.179161 PMID: PMC4854088 PMID: 27056346.
14. WHO. Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva: WHO; 2010.
15. WHO. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999.
16. WHO. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1992.
17. WHO. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1987.

Поступила 19.12.19

Принята к печати 21.12.19